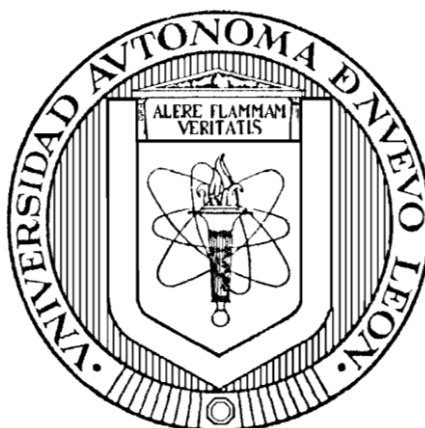


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO  
*Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* EN AISLAMIENTOS  
CLÍNICOS DEL NORESTE DE MÉXICO”**

**Presentado por:**

**Q.C.B. NÉSTOR GUADALUPE CASILLAS VEGA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO en  
CIENCIAS con Especialidad en Microbiología Médica**

**Julio, 201**

**“FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO**  
***Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS**  
**DEL NORESTE DE MÉXICO”**

**Aprobación de Tesis:**



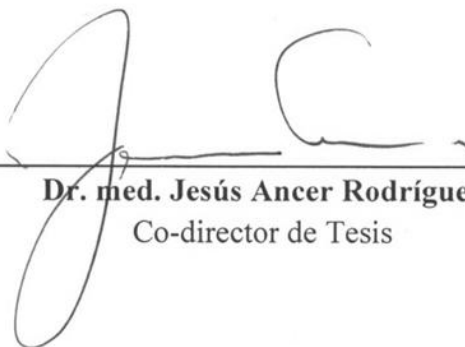
---

**Dr C. Gloria María González González**  
Director de Tesis



---

**Dr. C. Elvira Garza-González**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. med. Jesús Ancer Rodríguez**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO**  
***Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS**  
**DEL NORESTE DE MÉXICO”**

**Presentado por: Q.C.B. Néstor Guadalupe Casillas Vega**

Los sitios de estudio para la realización del presente trabajo fueron el Laboratorio de Micología así como en el Laboratorio de Microbiología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Gloria María González González.



---

**Dr C. Gloria María González González**  
Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

**- A Dios -**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por guiarme en el camino de la sabiduría, dirigirme por sendas de rectitud y siempre estar a mi lado.

Gracias **Mamá** por siempre creer en mí, por todo tu amor, apoyo, consejos, oraciones, escucharme, luchar por mí, por ser mi mayor ejemplo en mi vida.

Gracias **Papá** por todos sus consejos, a mis tíos **José Santos** y **Arcelia** por siempre contar con su apoyo, al **Pastor Julio** por todas sus palabras de aliento y fortaleza.

A mi gran amiga **Soraya Mendoza** por toda tu ayuda, tus consejos, sin ti esto no hubiera sido lo mismo, gracias por todos los momentos que vivimos juntos y seguiremos viviendo, gracias por ser mi apoyo y nunca dejar rendirme.

A mis compañeros de Posgrado, con un gran cariño a **Perla López**, **Samantha Flores** y **Paola Bocanegra** por siempre brindarme su ayuda, pero sobre todo por su gran amistad, por cada momento de felicidad y hacer esta etapa de mi vida especial siempre encontrándole lo positivo a la vida.

A mi comisión de Tesis, a la **Dra. Gloria González** por dirigir mi tesis, al **Dr. Jesús Ancer** por todo su apoyo y ser un ejemplo a seguir, a la **Dra. Elvira Garza** por su gran enseñanza y haberme inculcado el amor por la investigación.

Mi más sincero agradecimiento al **Dr. Rolando Tijerina** por permitirme realizar mi maestría y ser parte del departamento de Microbiología y su motivación por seguir adelante.

Agradezco profundamente a la **Dra. Guadalupe Gallegos** por su ayuda incondicional en cada etapa de mi vida, por confiar en mí, por la oportunidad de realizar una estancia en Madrid y conocer a excelentes personas como el **Dr. José Javier Sánchez**, al **Dr. Enrique Tabares** y **Beatriz Martín**.

A la **Srita. Imelda García** por toda la atención brindada a lo largo de mi vida profesional.

Al personal del departamento de Microbiología, a mis Maestros con especial cariño a la Maestra **Karina Tijerina** y **Marcela Mas** por su motivación constante; a las Químicas **Diana Rodríguez** y **Lydia Oviedo** por su apoyo en la parte experimental; a **Lucy Acevedo**, **Carlos Paz** y **Ángeles Quijano** por su gran ayuda.

A mis amigos por toda su motivación y cariño.

**Néstor Casillas Vega**

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 Características microbiológicas del complejo <i>C. neoformans/C. gattii</i>	4
1.3 Factores de patogenicidad del complejo <i>C. neoformans /C. gattii</i>	7
1.3.1 Cápsula	7
1.3.2 Ureasa	8
1.3.3 Lacasa	8
1.4 Posición filogenética de los géneros <i>Cryptococcus</i> y <i>Filobasidiella</i>	9
1.5 Nuevas especies patógenas de <i>Cryptococcus</i>	11
1.6 Epidemiología de la criptococosis	12
1.7 Manifestaciones clínicas	18
1.7.1 Criptococosis pulmonar	18
1.7.2 Criptococosis meníngea	19
1.7.3 Criptococosis cutánea	20
1.7.4 Otras localizaciones de la criptococosis	20
1.8 Estimación de la carga global de la meningitis criptocócica	21
1.9 Diagnóstico de laboratorio	22
1.10 Susceptibilidad antifúngica y tratamiento	23
1.10.1 Anfotericina B	27
1.10.2 Fluconazol	27

1.10.3 Voriconazol	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	31
4.1 Estrategia general	31
4.2 Identificación a nivel complejo por pruebas bioquímicas	32
4.3 Identificación a nivel especie por pruebas bioquímicas	33
4.4 Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	35
4.5 Identificación molecular	37
<b>5. RESULTADOS</b>	40
5.1 Identificación a nivel género y especie por pruebas bioquímicas	40
5.1.1 Procedencia de los aislamientos y población de estudio	41
5.2 Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	42
5.3 Identificación molecular	43
<b>6. DISCUSIÓN</b>	46
<b>7. CONCLUSIONES</b>	53
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	54
<b>9. REFERENCIAS</b>	55
<b>APÉNDICES</b>	71

## LISTA DE TABLAS

Figura		Página
1.	Estimación de casos de meningitis criptocócica y muertes entre las diferentes regiones del mundo de ONUSIDA	21
2.	Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	25
3.	Variación temporal y geográfica en la susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. neoformans</i> .	26
4.	Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .	42
5.	Genotipificación de los aislamientos clínicos del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .	44



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Representación esquemática de la relación y nomenclatura del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .	4
2.	Microfotografía de <i>C. neoformans</i> . Crecimiento de <i>C. neoformans</i> en agar dextrosa Sabouraud en botella y en placa de Petri.	5
3.	Cultivo de <i>C. gattii</i> , cultivo de <i>C. neoformans</i> .	6
4.	Cápsula polisacárida de <i>C. neoformans</i> por microscopía electrónica de barrido.	7
5.	Crecimiento de <i>Cryptococcus</i> spp en agar urea de Christensen.	8
6.	Modelo Mason-Roper para la melanogénesis de <i>C. neoformans</i> .	9
7.	Árbol filogenético de los miembros representativos de los Tremellomycetes.	10
8.	Morfología de las diversas especies no- <i>neoformans</i> .	11
9.	Ciclo de vida de las especies del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .	13
10.	Distribución de los ocho tipos moleculares en países Iberoamericanos.	12
11.	Distribución de los ocho tipos moleculares en América central, América del Norte, América del Sur, África, Asia, Europa y Oceanía.	16
12.	Distribución de los ocho tipos moleculares a nivel mundial.	16
13.	Distribución de los ocho tipos moleculares en México.	17
14.	Esquema de la estrategia general.	31
15.	Metodología para la identificación a nivel complejo.	34
16.	Metodología para la identificación a nivel especie.	34
17.	Metodología para los ensayos de susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> .	36
18.	Metodología para la identificación molecular.	39
19.	Distribución de los aislamientos identificados a nivel especie.	41
20.	Distribución de los ocho tipos moleculares en el noreste de México.	44
21.	Dendograma de 166 aislamientos clínicos del noreste de México.	45

## NOMENCLATURA

<b>ANB</b>	Anfotericina B
<b>AFLP</b>	Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CGB</b>	Canavanina glicina azul de bromotimol
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleótidos tri-fosfato
<b>FLC</b>	Fluconazol
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>ITC</b>	Itraconazol
<b>ITS</b>	Espaciador transcripcional interno
<b>L</b>	Litros
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µm</b>	Micrometros
<b>µL</b>	Microlitros
<b>MG</b>	Media geométrica
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLST</b>	Análisis de secuencias multi-locus
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PSC</b>	Posaconazol

<b>pMol</b>	Picomolar
<b>%</b>	Por ciento
<b>RFLP</b>	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAB</b>	Agar dextrosa sabouraud
<b>TARAA</b>	Terapia antirretroviral altamente activa
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>var.</b>	Variedad
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia adquirida
<b>VRC</b>	Voriconazol
<b>5FC</b>	5-Fluorocitosina
<b>ITC</b>	Itraconazol

## RESUMEN

Q.C.B. Néstor Casillas Vega

Fecha de Graduación: Julio, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título: “FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL NORESTE DE MÉXICO”**

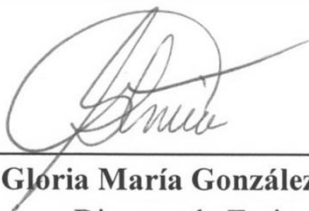
**Número de páginas: 75**

Candidato al Grado de MAESTRO en CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica.

**Área de estudio: Microbiología Médica.**

**Propósito y Método de estudio:** El complejo *C. neoformans* / *C. gattii* está conformado por células levaduriformes, esféricas u ovoides de un diámetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$  con gemación unipolar o multipolar. La morfología macroscópica se caracteriza por colonias brillantes, mucoides de color crema a marrón que se desarrollan dentro de 2 a 3 días, con incubación a 37°C en los medios convencionales de diagnóstico microbiológico. Este complejo comprende dos especies, *C. neoformans* y *C. gattii*. En base a la reacción de aglutinación del antígeno capsular existen 5 serotipos, los cuales están subdivididos en 8 tipos moleculares basados en los polimorfismos de secuencia del DNA. El objetivo del estudio fue caracterizar el fenotipo y genotipo de las especies del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* en aislamientos clínicos del noreste del México. Se incluyeron 166 aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* de origen clínico. Los aislamientos se identificaron por las pruebas bioquímicas: asimilación de carbohidratos, producción de melanina, ureasa y asimilación de glicina. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* por el método de macrodilución en tubo utilizando anfotericina B, fluconazol y voriconazol. Se llevó a cabo la genotipificación mediante PCR fingerprinting empleando el primer específico de la secuencia del microsatélite del fago M13.

**Contribuciones y Conclusiones:** De acuerdo a las pruebas bioquímicas, 153 aislamientos se identificaron como *C. neoformans* y 13 como *C. gattii*. El 100% de los aislamientos del complejo fueron susceptibles a todos los fármacos probados. Se detectaron los ocho tipos moleculares del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*. VNI (75%), VNII (9%), VNIII (5%), VNIV (3%), VGI (4%), VGII (2%), VGIII (1%), VGIV (1%). Se confirma la presencia de *C. gattii* en el noreste de México y se encontró alta diversidad clonal del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*



---

**Dr. C. Gloria María González González**  
Director de Tesis

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Antecedentes históricos

En 1894 el científico italiano Sanfelice, aisló una levadura capsulada a partir de zumo del durazno fermentado, clasificándola como *Saccharomyces neoformans*; demostró su patogenicidad inoculando esta levadura en animales de experimentación y observó la producción de lesiones cerebrales (1). Al mismo tiempo, en Alemania, Busse en 1894 y Buschke en 1895, notificaron por separado, el primer aislamiento de un hongo de características similares a partir de una lesión pseudosarcomatosa de la tibia de una mujer de 31 años. La paciente murió de una enfermedad diseminada y el hongo fue denominado como *Saccharomyces hominis* (2, 3).

Curtis, en 1896 aisló de un absceso inguinal en un joven paciente una especie de levadura que parecía causar tumores mixomatosos. Al inocular subcutáneamente en animales de experimentación, obtuvo la formación de lesiones tumorales en pulmones, bazo y riñones. Curtis nombró esta cepa como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (4).

En 1901 Vuillemin y colaboradores, al estudiar esta levadura no encontraron las típicas ascosporas que caracterizan al género *Saccharomyces*, además observaron que no fermentaba los carbohidratos y lo clasificaron en el género *Cryptococcus* (5). En 1916, Stoddard y Cutler, describieron los aspectos clínicos de la enfermedad y le dieron el nombre de *Torula histolytica* ya que observaron una zona lítica alrededor de los tejidos del huésped que en realidad correspondía al material capsular de la levadura (6). En 1935, Benham definió los caracteres morfológicos, serológicos y los criterios de identificación de más de 40 cepas que incluían las originales de Sanfelice, Busse y Curtis, concluyendo que todos los aislamientos humanos procedían probablemente de una misma especie y propuso conservar el nombre de *Cryptococcus neoformans* (7). En 1950, Evans y colaboradores, continuaron con los estudios de Benham, encontrando diferencias serológicas en base a las reacciones de aglutinación capsulares de los aislamientos e identificaron tres serotipos: A, B y C. El serotipo D fue descubierto veinte años después por Wilson y colaboradores (8).

En 1951, Emmons hizo un importante descubrimiento en la epidemiología de *C. neoformans*, al aislarlo de la tierra, de los nidos y guano de las palomas (9, 10).

En 1962, Staib descubrió que *C. neoformans* producía colonias de color marrón en un medio que contenía un extracto de *Guizotia abyssinica* (11). Unos años más adelante en 1968 Kauffman y colaboradores reportaron la prueba de antígeno polisacárido criptocócica, una de las pruebas micológicas más utilizadas actualmente para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (12).

Snider y colaboradores establecieron por primera vez el vínculo entre pacientes con SIDA y la criptococosis (13). Actualmente la infección por VIH sigue siendo el mayor factor de riesgo para la aparición de la criptococosis en el mundo (14).

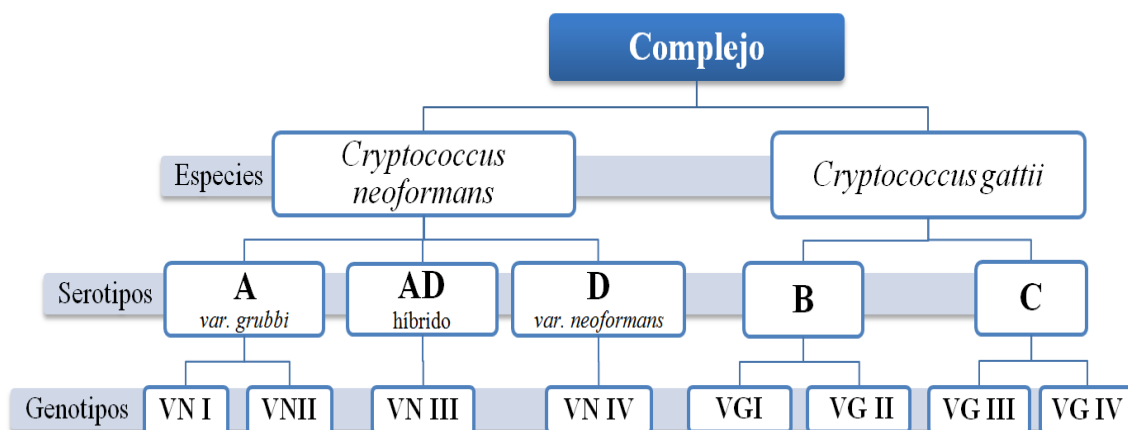
En 1999 utilizando técnicas innovadoras de biología molecular aplicadas al área de genética microbiana y patogénesis se inició el proyecto de secuenciación del genoma de *C. neoformans*. El objetivo de este proyecto fue obtener la secuencia completa del genoma de al menos dos y posiblemente cuatro cepas que representen la mayoría de los serotipos/variedades/especies de este organismo (15).

Boekhout y colaboradores en 2001 utilizaron la técnica de Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica, con el fin de detectar polimorfismos en el genotipo. Estas diferencias son registradas como patrones variables en número y tamaño de las bandas generadas (16).

En 2002, Kwon-Chung propuso separar filogenéticamente a *C. neoformans* y *C. gattii*, dando como resultado el complejo *C. neoformans* / *C. gattii*. En la actualidad, este complejo contiene dos especies, *C. neoformans* y *C. gattii*. En base a las reacciones de aglutinación del antígeno capsular existen 5 serotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), y un serotipo híbrido AD y *C. gattii* (serotipos B y C) (17).

El complejo *C. neoformans* / *C. gattii* se subdivide en 8 distintos tipos moleculares basados en los polimorfismos de secuencia del DNA, detectados por PCR fingerprinting, RFLP, MLST entre otras técnicas moleculares. Los aislamientos

correspondientes a *C. neoformans* producen patrones VNI, VNII, VNIII y VNIV. *C. gattii* produce patrones VGI, VGII, VGIII Y VGIV (Fig. 1) (18).

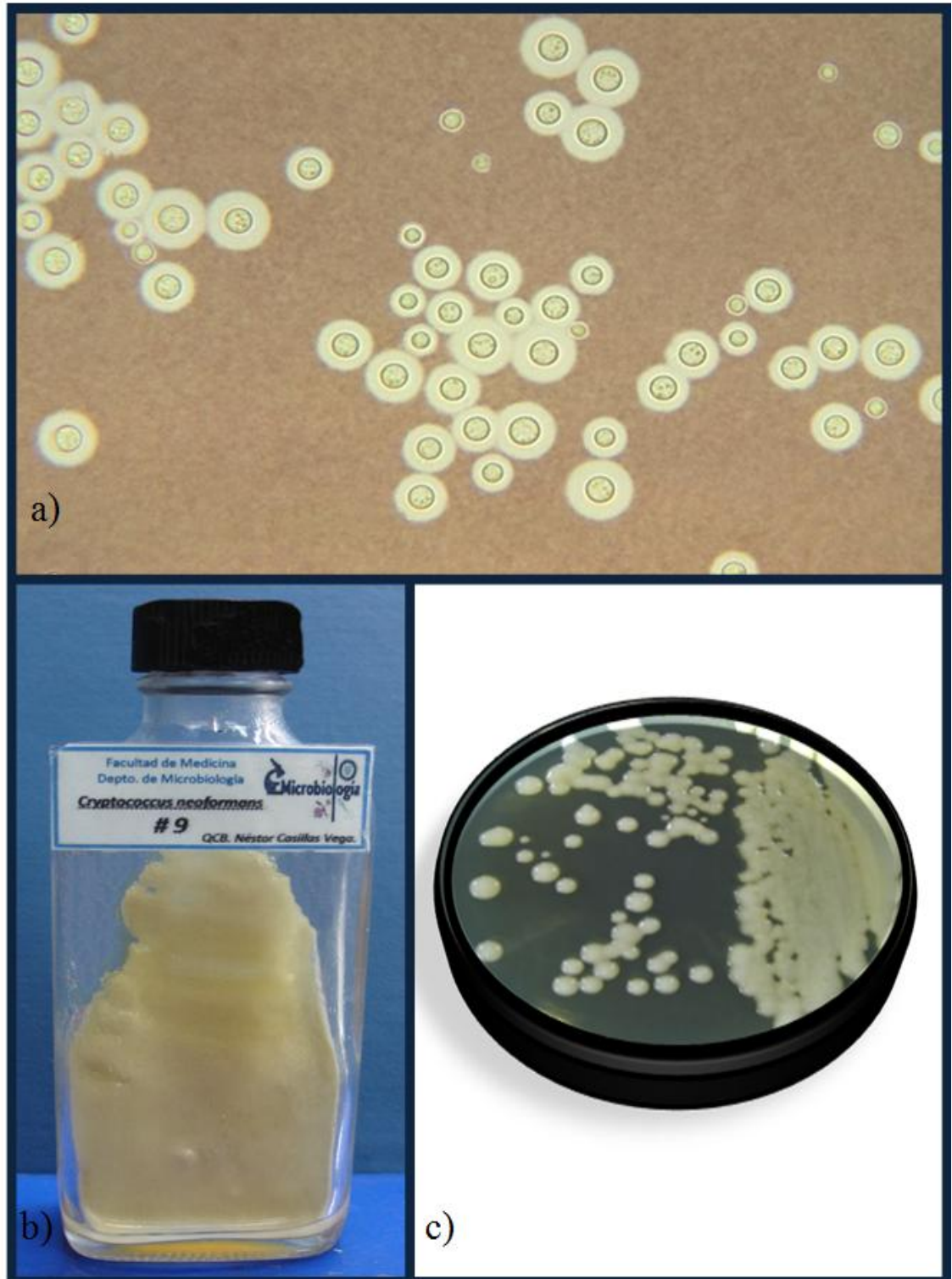


**Figura 1.** Representación esquemática de la relación y nomenclatura del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*.

## 1.2 Características microbiológicas del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*

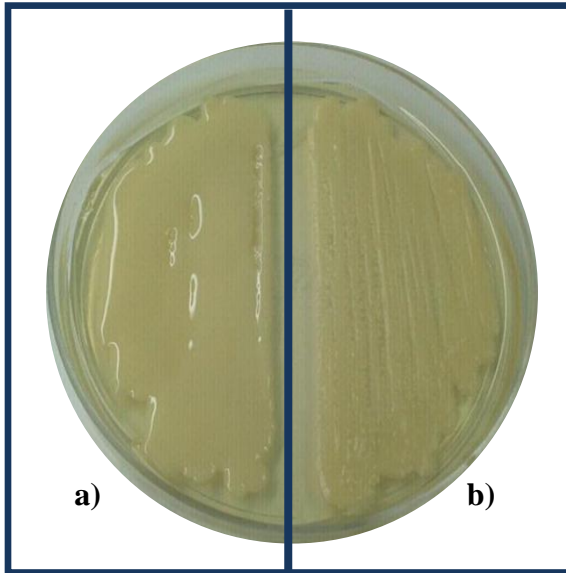
El complejo *C. neoformans* / *C. gattii* está conformado por células levaduriformes, esféricas u ovoides y a veces de forma alargada con gemación unipolar o multipolar (19). La morfología macroscópica se caracteriza por colonias brillantes, mucoides de color crema a marrón en término de 2 a 3 días, crece a 37°C en los medios convencionales de diagnóstico microbiológico como el agar dextrosa Sabouraud como se observa en la Figura 2 (20, 21).





**Figura 2.** (a) Microfotografía de *C. neoformans*. (b) Crecimiento de *C. neoformans* en agar dextrosa de Sabouraud en botella y (c) en placa de Petri.

Ciertas características macroscópicas se asocian especialmente con cada especie del complejo. Las colonias de *Cryptococcus gattii* crecen sobre los medios convencionales generalmente mas mucosas y mas húmedas que las colonias de *C. neoformans* (Fig. 3) (22).



**Figura 3.** (a) Cultivo de *C. gattii*, (b) cultivo de *C. neoformans*.

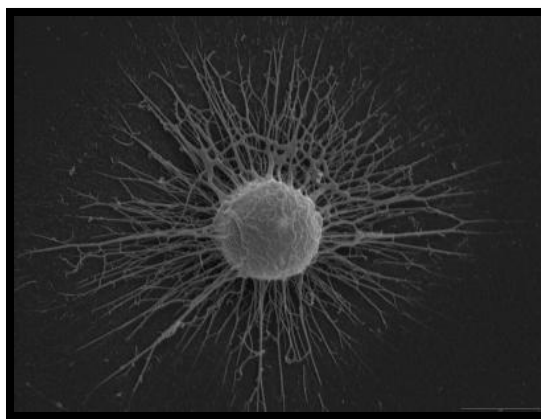
*C. neoformans* y *C. gattii* producen una cápsula mucopolisacárida que les confiere el aspecto macroscópico mucoide cremoso (23). La cápsula en el huésped infectado puede llegar a ser muy voluminosa con un diámetro mayor que el de la propia levadura (24, 25). En cambio en cultivo y luego de realizar varias resiembras de la misma cepa en medio SDA, la cápsula disminuye su tamaño y puede llegar a perderse. La preparación en fresco más utilizada para la visualización de la cápsula es la tinta china que permite la observación con contraste oscuro sobre el que destaca la célula con su cápsula refringente (26).

### 1.3 Factores de patogenicidad del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*

La patogénesis de la criptococosis se asocia a múltiples factores de virulencia (23, 27) tales como la cápsula, la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática, como la fosfolipasa, proteinasa, fenoloxidasa y la ureasa (28).

#### 1.3.1 Cápsula

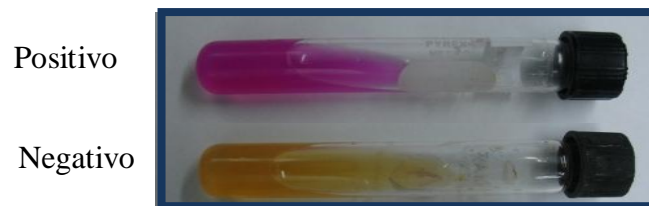
En la figura 4 se puede observar la cápsula polisacárida compuesto principalmente por xilosa, manosa y ácido glucurónido (29). Esta composición particular de la cápsula de *Cryptococcus* spp. la distingue de otros hongos de interés clínico ya que no contiene almidón, glucógeno, ni sulfato de mucoitina (30). Contiene gran variación en la estructura polisacárida, produciendo diferentes reacciones antigénicas y en base a ello, las cepas se dividen en serotipos A, D, AD para *C. neoformans* y los serotipos B, C para *C. gattii* (29, 31, 32). La presencia de la cápsula se puede visualizar mediante una preparación con tinta china, reacciones inmunológicas y la utilización de microscopía electrónica. El tamaño capsular puede ser variable desde  $<1\mu\text{m}$  a  $>50\mu\text{m}$  de diámetro dependiendo de la cepa, medioambiente y las condiciones de crecimiento (33).



**Figura 4.** Cápsula polisacárida de *C. neoformans* por microscopía electrónica de barrido.

### 1.3.2 Ureasa

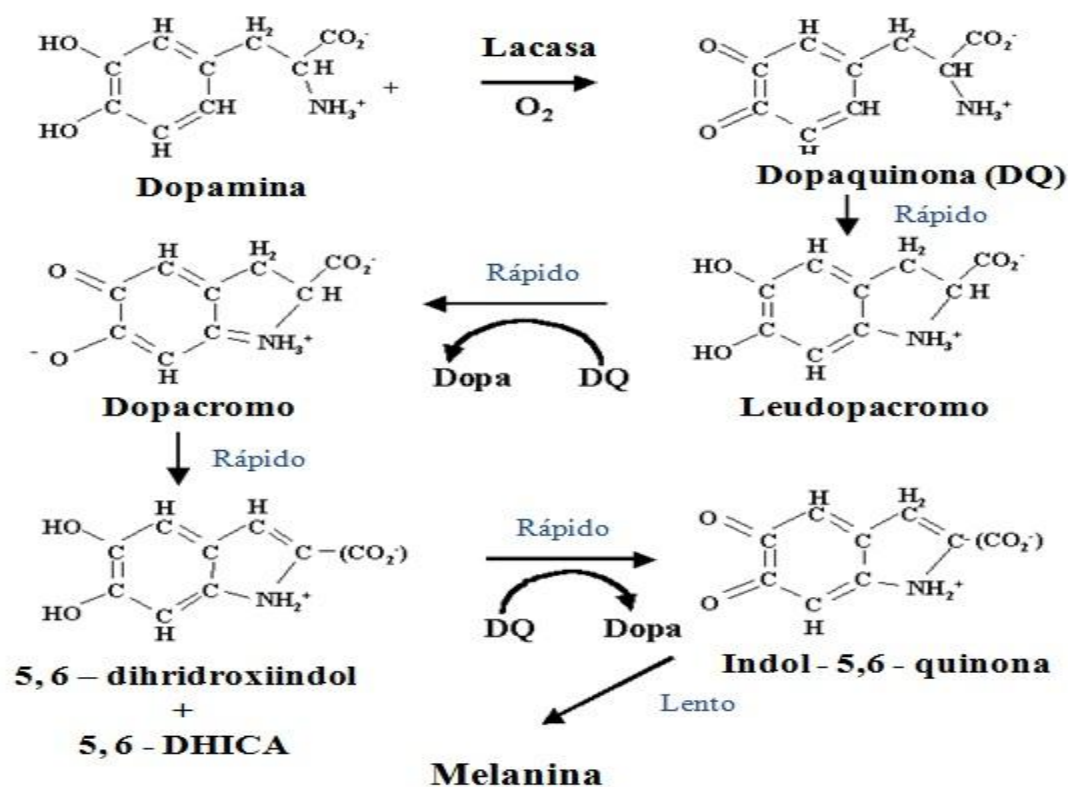
Es una níquel-metaloenzima cuya función es catalizar la hidrólisis de la urea. La actividad de la ureasa se pone de manifiesto como una prueba de identificación de esta levadura mediante el medio de agar urea de Christensen (Fig. 5) (34). Se ha descrito que la ureasa puede contribuir al paso de estas levaduras a través de la barrera hematoencefálica favoreciendo el desarrollo de criptococosis meníngea (35).



**Figura 5.** Crecimiento de *Cryptococcus* spp. en agar urea de Christensen

### 1.3.3 Lacasa

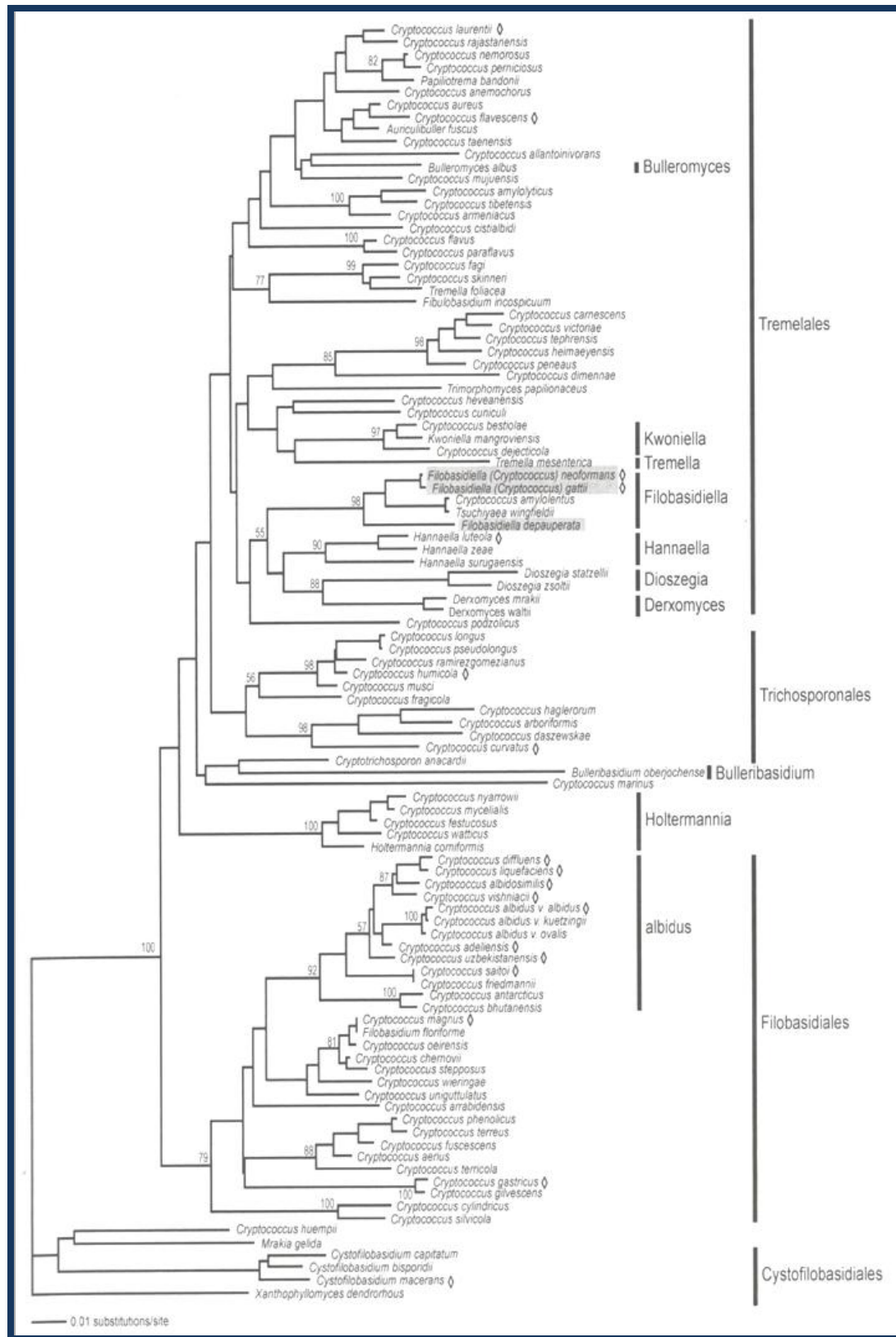
Otro factor de patogenicidad atribuido a *C. neoformans* es la capacidad de producir melanina debida a la actividad enzimática de la lacasa (36). La presencia de compuestos dihidroxifenólicos o poliaminobencénicos y en condiciones de bajo contenido de glucosa (Fig. 6). La lacasa del género *Cryptococcus* se encuentra unida a la pared celular y la melanina resultante de su actividad, se le atribuyen efectos de protección contra los antioxidantes, dando soporte a la integridad de la pared celular (37), protección frente a temperaturas extremas (38), interferencia con la fagocitosis mediada por anticuerpos y con la respuesta de los linfocitos T, así como se ha considerado que contribuye a la defensa contra diversas proteínas microbidas y a la reducción en la sensibilidad a ciertos antifúngicos (39).



**Figura 6.** Modelo Mason-Roper para la melanogénesis de *C. neoformans*.

#### 1.4 Posición filogenética de los géneros *Cryptococcus* y *Filobasidiella*

El género *Cryptococcus* contiene actualmente 70 especies que sólo se conocen en su estado anamorfo (Fig. 7) (40). Las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* se clasifican en el estado teleomorfo *F. neoformans* y *F. bacillisporus* respectivamente (41, 42).



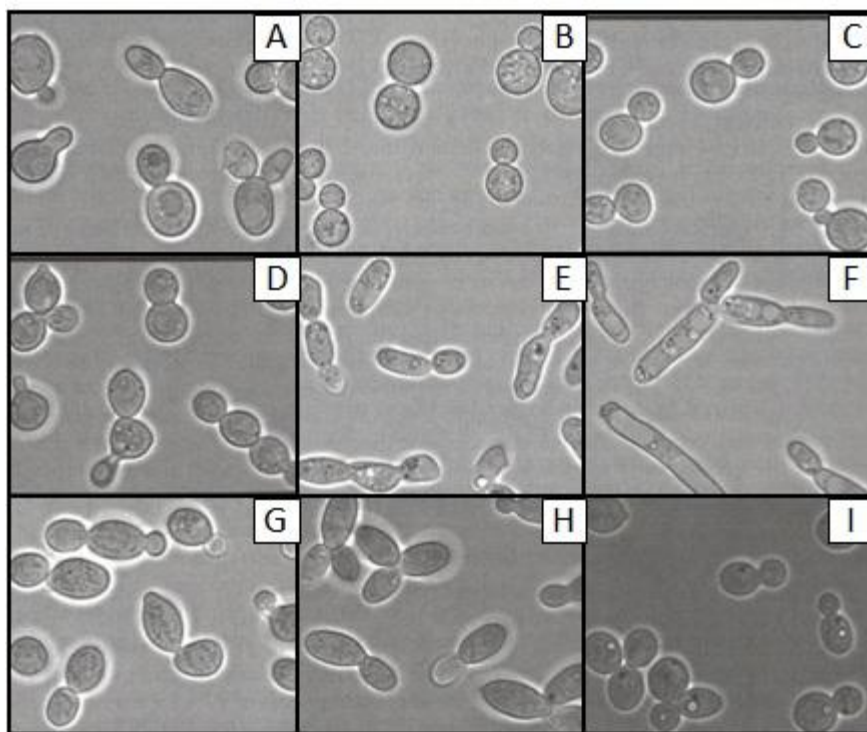
**Figura 7.** Árbol filogenético de los miembros representativos de los Tremellomycetes para demostrar la diversidad del género *Cryptococcus*.



## 1.5 Nuevas especies patógenas de *Cryptococcus*

Además de *C. neoformans* y *C. gattii*, que son importantes patógenos en humanos y animales, existen aproximadamente otros 15 miembros de este género, a los cuales se les refiere como no-*neoformans*, que han aparecido en aislados clínicos humanos con frecuencia (Fig. 8). Estos son *C. adeliensis*, *C. albidosimilis*, *C. albidus*, *C. curvatus*, *C. diffluens*, *C. flavescens*, *C. gastricus*, *C. humicola*, *C. laurentii*, *C. liquefaciens*, *C. luteolus*, *C. macerans*, *C. magnus*, *C. saitoi*, *C. uzbekistanensis* y *C. vishniacii* (40).

*C. laurentii* y *C. albidus* se recuperan con una frecuencia lo suficientemente alta como para ser considerados como patógenos oportunistas en los humanos, comprenden aproximadamente el 80% de los casos no-*neoformans* (43).



**Figura 8.** Morfología de las diversas especies no-*neoformans*. (A) *C. laurentii*; (B) *C. magnus*; (C) *C. albidus*; (D) *C. aerius*; (E) *C. curvatus*; (F) *C. humicola*; (G) *C. luteolus*; (H) *C. macerans*; (I) *C. gastricus*.

## 1.6 Epidemiología de la criptococosis

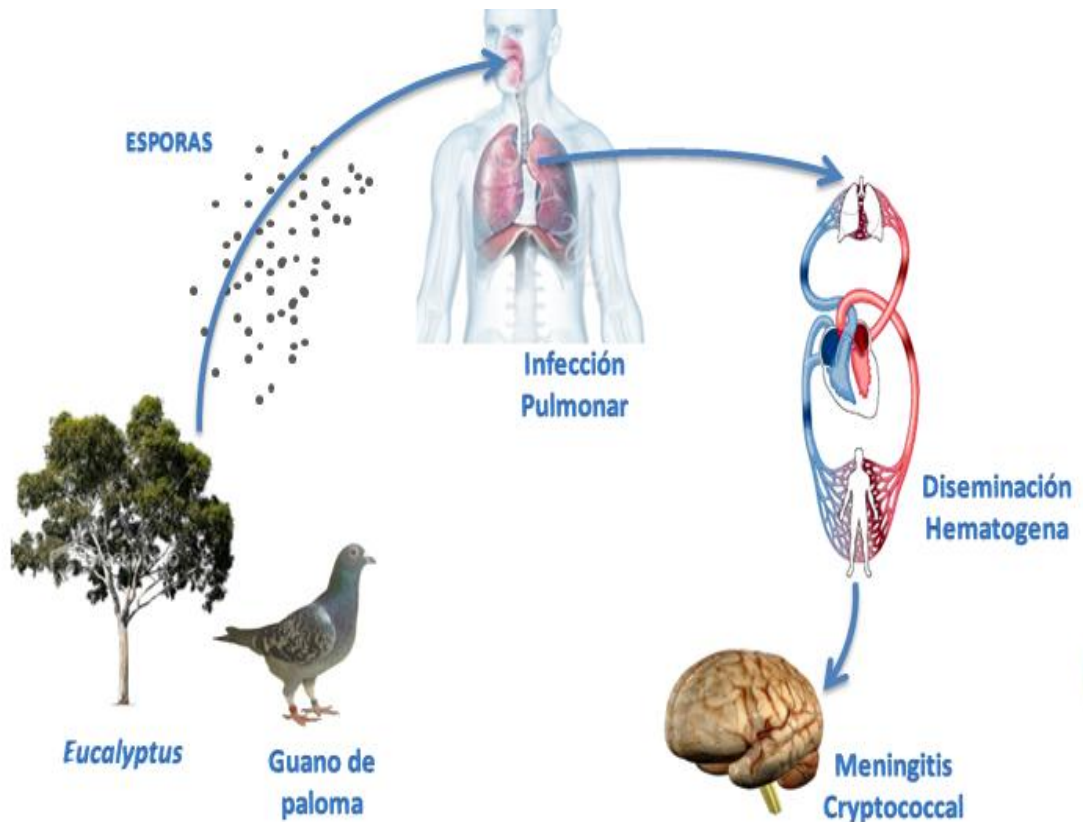
La criptococosis es adquirida fundamentalmente por la inhalación de las células de levadura desecadas de fuentes ambientales, particularmente en los suelos contaminados por guano de palomas (44). Debido a su contenido en nitrógeno, creatinina y una elevada concentración de sales, las levaduras pueden mantenerse viables en excrementos de paloma durante un período largo de tiempo, incluso años si están protegidas de los rayos del sol (10) y en el caso de *C. gattii* en la madera y otras partes de diversas especies de árboles de *Eucaliptus* (45, 46). Las aves particularmente las palomas se creen que pueden haber sido las responsables de la dispersión de *Cryptococcus* spp. en todo el mundo (47) ocasionando en el humano una infección pulmonar primaria que frecuentemente es asintomática y puede ser erradicada dentro de un granuloma (48). Sin embargo, dependiendo de los factores del huésped, el tamaño del inóculo y posiblemente la virulencia de la cepa, el microorganismo puede diseminarse de forma aguda o luego de un período de latencia a sitios extra pulmonares produciendo diferentes cuadros clínicos siendo el más grave el ataque al sistema nervioso central (49).

Inicialmente se consideró que *C. gattii* presentaba una distribución geográfica muy restringida relacionada con zonas de ríos y bosques donde se encontraban especies de *Eucalytus canaldulensis* pero a lo largo de los años se ha aislado de muestras ambientales de suelo y árboles a diferencia de *C. neoformans* que se ha aislado en todo el mundo (50).



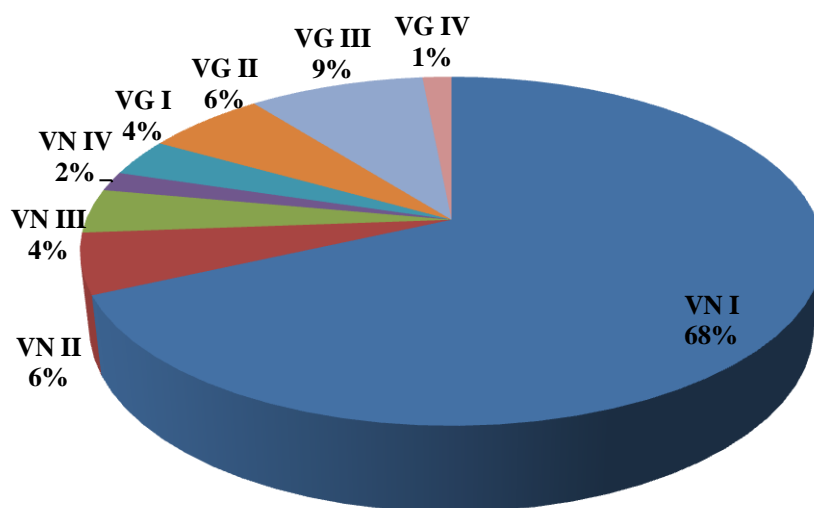
La criptococosis por *C. gattii* se ha considerado una micosis de países tropicales debido que la mayoría de los casos se han registrados en países con clima tropical (51). Los casos clínicos descritos fuera de esas zonas se consideran casos excepcionales y siempre se trata de establecer relaciones entre el paciente o el ambiente que lo rodea con algún elemento importado, viaje o procedencia de un país tropical (52, 53).

La criptococosis aumentó a principios de la década de 1980 por la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (14). Hasta 1998, la criptococosis fue considerada la cuarta causa de muerte en pacientes con SIDA (17) pero afortunadamente con el desarrollo y aplicación de las terapias inhibitoras de la proteasa y los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARAA) se ha reducido significativamente en países desarrollados (54).



**Figura 9.** Ciclo de vida de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*.

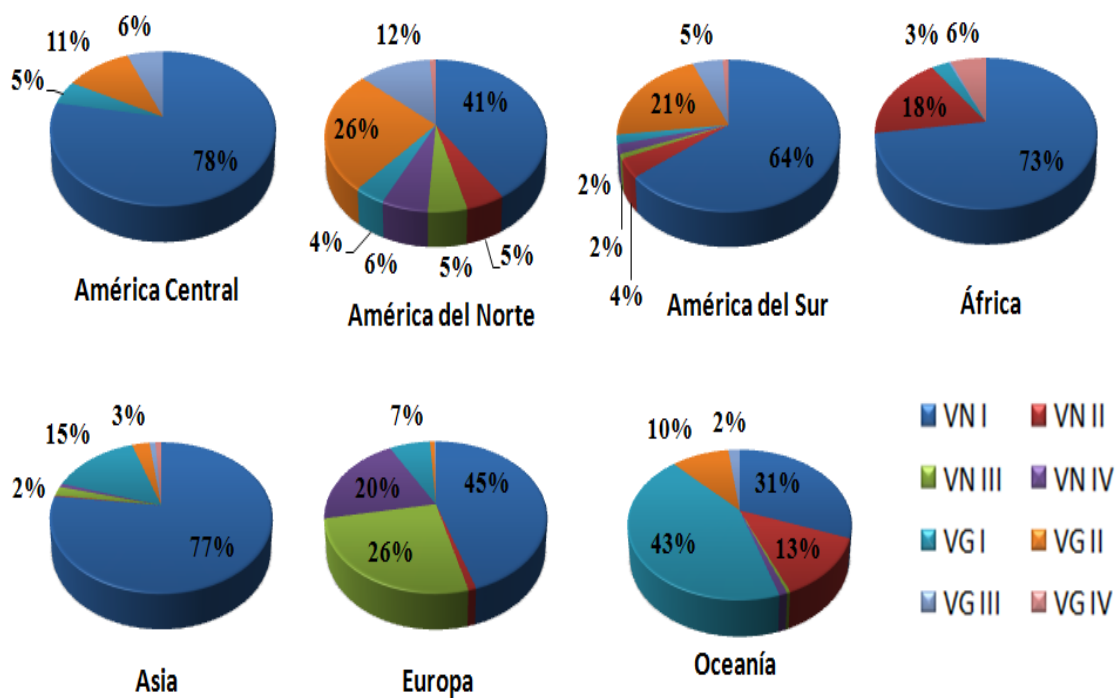
Uno de los trabajos reportados sobre la genotipificación del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* es el realizado por Meyer y una red de colaboración entre investigadores de varios países iberoamericanos a finales de 1990. La red fue creada para estudiar la epidemiología molecular de los agentes de la criptococosis en América Latina y España (55). Mediante las técnicas de PCR fingerprinting con el primer específico de la secuencia del microsatélite del fago 13 y el análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) del gen Orotininda Pirofosforilada URA5 (56). En el estudio se agruparon las 340 cepas en ocho tipos moleculares, de los cuales la especie *C. neoformans* se aisló con una frecuencia del 80% y el 20% restante fue de *C. gattii* (Fig. 10). El patrón VNI se presentó en gran proporción en Guatemala, Perú, Brasil y Argentina. VNII en Chile con 16% de frecuencia y Colombia con un 11%. España presentó un porcentaje elevado del patrón molecular VNIII, el cual representó un 42% de frecuencia. En cuanto a los genotipos correspondientes a *C. gattii*, el patrón molecular VGI solo se presentó en España, Venezuela y Perú con un 32%, 28% y 7% de frecuencia respectivamente. El genotipo VGII, se presentó en Brasil con 14%, Colombia con 13% y Argentina con una frecuencia baja de 2%; VGIII solo se presentó en Colombia en un 24% de frecuencia y en Argentina con un 2 %. En conclusión se confirmó que la mayoría de infecciones fueron causadas por el tipo molecular VNI que pertenece a *C. neoformans* var. *grubii* el cual representó un 68.2% de los aislamientos totales.



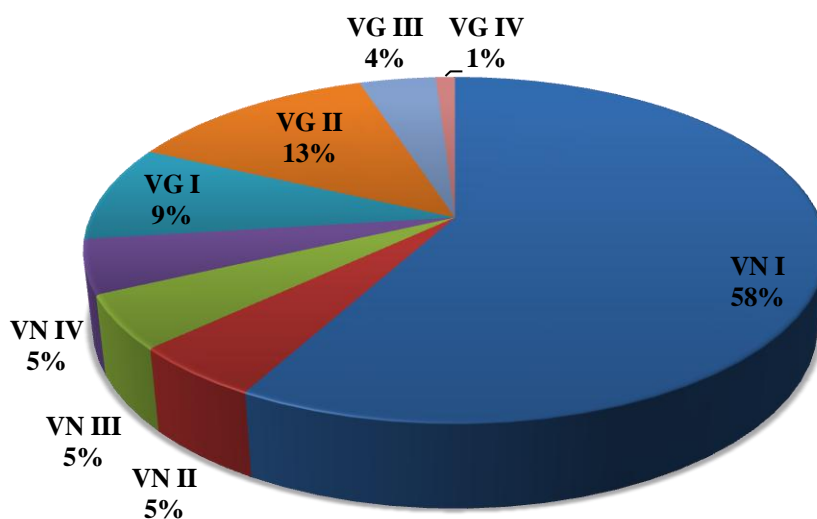
**Figura 10.** Distribución de los ocho tipos moleculares en países Iberoamericanos (55).

En la figura 11 se muestra la distribución de los 8 distintos tipos moleculares en las diferentes regiones del mundo. Se encontró que los tipos moleculares VNIII y VNIV no sólo se encuentran principalmente en Europa como se informó anteriormente (57), también están presentes en América del Norte. El genotipo VGI se encontró en mayor proporción en Oceanía en donde existen reportes de criptococosis por *C. gattii* a diferencia del resto del mundo (58).

En África existe mayor frecuencia de aislamientos correspondientes al genotipo VNI de *C. neoformans* debido a que la mayoría se ha aislado de pacientes con inmunosupresión (59). En los países de América se observó una relación homogénea en cuanto a los porcentajes de los diferentes patrones moleculares (55, 60-62). En conclusión se analizaron un total 2755 aislamientos, entre los cuales 2046 eran clínicos, 68 veterinarios y 604 ambientales, con un 58% de los aislamientos fueron clasificados como *C. neoformans* var. *grubbi* (Fig. 12) (55, 60, 61, 63, 64).



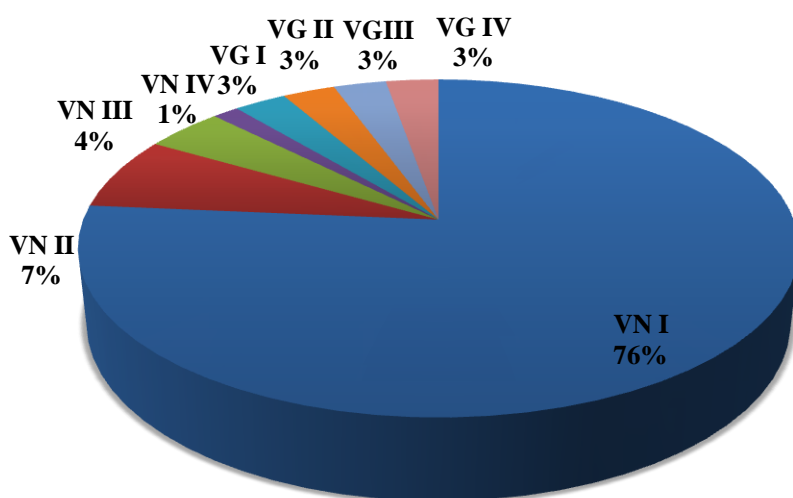
**Figura 11.** Distribución de los ocho tipos moleculares identificados en América central (55), América del Norte (65), América del Sur (55), África (66), Asia (67), Europa (68) y Oceanía (57).



**Figura 12.** Distribución de los ocho tipos moleculares a nivel mundial.

Uno de los últimos estudios realizados en América Latina, se llevó a cabo en México por Castañón Olivares y colaboradores (69), el cual incluyó 72 aislamientos de 72 pacientes ingresados desde 1994 a 2004 en tres hospitales de referencia en el Distrito Federal. Los aislamientos fueron identificados sobre la base del tamaño de la cápsula y la morfología colonial en agar SDA. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* revelaron que el 100% de los aislamientos fueron susceptibles a ketoconazol, fluconazol (FLC), itraconazol, anfotericina B (ANB) y los 72 aislamientos resistentes a caspofungina. La genotipificación se realizó mediante la técnica de PCR fingerprinting en base a los criterios propuestos por Meyer y colaboradores; la frecuencia del genotipo se muestra en la figura 13. Todos los genotipos VN fueron aisladas de pacientes con SIDA y todos los genotipos VG fueron aisladas de los pacientes que no padecían de SIDA.

La identificación de *C. gattii* de climas medio seco y cálido en México confirma eficazmente, una vez más, que la distribución de *C. gattii* no se limita a las zonas tropicales y subtropicales como tradicionalmente se había considerado.



**Figura 13.** Distribución de los ocho tipos moleculares identificados en México (69).

## 1.7 Manifestaciones clínicas

La criptococosis es una infección exógena, cosmopolita de evolución subaguda o crónica tradicionalmente considerada como oportunista (70, 71)

### 1.7.1 Criptococosis pulmonar

La principal vía de entrada de las levaduras del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* es la vía respiratoria. La inhalación de las esporas ocasiona una primoinfección pulmonar (72), la cual suele ser asintomática o con la presentación de síntomas inespecíficos (tos, fiebre, disnea, pérdida de peso y dolor pleurítico) que dificultan el diagnóstico (73). Por la presentación de los síntomas se requiere un diagnóstico diferencial con la tuberculosis y otras patologías infecciosas (74). Esta es la primera etapa de primoinfección la cual puede limitarse o progresar dependiendo de la capacidad de resistencia del huésped (75). Las lesiones pulmonares se pueden presentar en cualquier zona y las imágenes radiológicas suelen ser también inespecíficas, observándose infiltraciones localizadas no muy extensas las cuales suelen ser lesiones pequeñas y por ello pasar desapercibidas en la radiografía simple tórax (76).

*C. neoformans* y *C. gattii* no forman parte de la flora normal en el hombre pero se ha comprobado en estudios en animales que pueden ser colonizadores transitorios del tracto respiratorio inferior y superior (77), observándose a *Cryptococcus* spp. en el interior de macrófagos de tejido intersticial del criptococoma pulmonar (78).

### 1.7.2 Criptococosis meníngea

La meningitis criptocócica es la presentación clínica más frecuente constituyendo la expresión del neurotropismo del hongo (79), debido a la ausencia de factores inhibidores del crecimiento en el líquido cefalorraquídeo y la presencia de factores nutricionales en el tejido nervioso que puedan funcionar como fuente de nitrógeno y estimular el crecimiento de las levaduras del complejo (78, 80), se presume que *C. neoformans* puede escapar del sistema inmune del huésped en el LCR, debido a la baja tasa de unión de la fracción C3 del sistema de complemento a la superficie de la cápsula (28). La baja concentración de glucosa presente en las meninges también puede favorecer el tropismo por el SNC ya que se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa inhiben la acción de la enzima fenoloxidasa (81). La acción de esta enzima protege a las células fúngicas contra ciertas sustancias oxidantes como los rayos UV que suelen tener efecto fungicida y también actúa como protección contra la acción de algunos antifúngicos (82).

En los enfermos de SIDA con meningitis criptocócica, el LCR puede ser de apariencia normal sin ninguna alteración importante (83), el aspecto puede ser claro con hiperproteínorrea variable y disminución ligera de glucosa (84).

Otra patología que puede afectar al SNC es el desarrollo de tumoraciones llamadas criptocomas, ocurriendo principalmente en sujetos inmunosuprimidos (85). Las tumoraciones se tratan de una masa granulomatosa de curso crónico que puede producir hipertensión craneal con signos y síntomas como náuseas, vómitos, cefaleas y hemiparesias; se puede presentar somnolencia así como cambios de personalidad,

trastornos mentales, alucinaciones, irritabilidad, confusión, llegando a sufrir incluso ataques epilépticos (80).

### **1.7.3 Criptococosis cutánea**

Estas lesiones suelen ser manifestaciones de enfermedad diseminada en pacientes con inmunosupresión y ocurren en un 10% de los casos. Las lesiones se pueden presentar como vesículas o abscesos que se ulceran con aspecto maculopapular y pústulas. La cara y el cuello son las zonas más afectadas aunque existen reportes que mencionan que también se afecta la región torácica (86). Las lesiones que se distribuyen en cara y cuello pueden simular otras enfermedades dermatológicas como por ejemplo el carcinoma basocelular, paracoccidiodomicosis, histoplamosis diseminada y *Molluscum contagiosum* (87).

### **1.7.4 Otras localizaciones de la criptococosis**

A pesar del fuerte tropismo que tiene *C. neoformans* y *C. gattii* por el sistema nervioso central se pueden presentar micosis profundas con otras localizaciones aunque son poco usuales. Se han descrito casos de abscesos en huesos craneales y osteomielitis (88), atrofia ocular (89), afección al tracto genital y del sistema urinario (90). El papel de la próstata es importante en el proceso de mantenimiento de la infección ya que la próstata actúa como reservorio de las levaduras y puede dar origen a reinfecciones (91).



## 1.8 Estimación de la carga global de la meningitis criptocócica

Utilizando los datos epidemiológicos disponibles, se ha estimado recientemente la carga global de la meningitis criptocócica en personas con VIH en términos de casos y muertes anuales.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y la Organización Mundial de la Salud han realizado numerosos estudios sobre la criptococosis para medir la carga específica de la enfermedad en todo el mundo(92, 93). Según lo reportado por ONUSIDA en el 2006 (Tabla 1), que aproximadamente 958,000 casos de meningitis por criptococosis ocurren cada año (rango, 371,700 a 1, 544,000) (94).

**Tabla 1.** Estimación de casos de meningitis criptocócica y muertes entre las diferentes regiones del mundo de ONUSIDA.

Región		VIH prevalencia en 1,000s	Estimación por año de casos de meningitis criptocócica (rango) en 1,000s	Tasa de letalidad (%)	Estimación de muertes (rango) en 1,000s
África	Sur	22,500	720 (144.0-1,296.0)	70	504.0 (100.8-907.2)
	Norte	380	6.5 (1.3-11.6)	55	3.6 (0.7-6.4)
	Oriente				
Asia	Sur	4,000	120 (24.0-216.0)	55	66.0 (13.2-118.8)
	Oriente	800	13.6 (2.7-24.5)	9	1.2 (0.2-2.2)
Oceanía		75	0.1 (0.0-0.1)	9	0.009 (0.0-0.009)
Europa	Occidental	760	0.5 (0.1-1.0)	9	0.045 (0.009-0.09)
	Central				
América	Norte	1,300	7.8 (1.6-14.0)	9	0.7 (0.1-1.3)
	Central	230	7.8 (1.6-14.0)	9	0.7 (0.1-1.3)
	Sur	1,600	54.4 (10.9-97.9)	55	29.9 (6.0-53.8)
Global		33,200	957.9 (371.7-1544.0)		624.7 (125.0-1,124.9)

## 1.9 Diagnóstico de laboratorio

Para llevar a cabo la identificación del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* en el laboratorio de diagnóstico clínico se cuenta con diversos métodos, entre los cuales destaca el examen directo en fresco mediante la tinta china (95).

Una de las técnicas más conocidas y utilizadas para la serotipificación de *C. neoformans* y *C. gattii* fue la prueba de “Crypto Check Iatron” (no se encuentra disponible de forma comercial), en donde mediante aglutinación con partículas de látex recubiertas con antígenos capsulares de *Cryptococcus* se puede determinar el serotipo correspondiente (96).

El complejo *C. neoformans* / *C. gattii* posee características comunes que no permiten identificar cada especie por separado en un laboratorio de rutina. Ambas especies son ureasa positivo al sembrarlas en agar de urea de Christensen (97), poseen cápsula que se evidencia con la tinta china y el mismo patrón de asimilación de carbohidratos mediante el sistema API 20 C AUX, lo que no permite distinguir entre *C. neoformans* y *C. gattii* (98). La producción de melanina mediante el agar alpiste negro, permite la diferenciación entre las especies del complejo de otras especies de *Cryptococcus* (99).

Existen varias formas para la diferenciación de *C. neoformans* y *C. gattii*. Una de ellas es a través de la capacidad de crecimiento en medio enriquecido con canavanina y glicina utilizando el medio de cultivo conocido como agar CGB (llamado así por su contenido de Canavanine-Glycine Bromotymol blue). *C. gattii* a diferencia de *C. neoformans* es capaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono además es

resistente a la canavanina. *C. gattii* crece en este medio de cultivo produciendo la alcalinización del medio lo cual se evidencia con la aparición de color azul intenso, debido a la liberación de amonio durante la degradación de la glicina (100, 101). Otra forma tradicional de identificar a *C. neoformans* y *C. gattii* es a través de la asimilación de D-prolina y D-triptofano (102), *C. gattii* utiliza ambos aminoácidos como fuente de nitrógeno.

Mediante técnicas de biología molecular y genotipificación, también se puede realizar la identificación precisa a nivel de genotipo de levaduras de *Cryptococcus* spp. Se pueden citar: Hibridación, PCR anidada, PCR Multiplex y PCR en tiempo real. Para la tipificación se pueden utilizar PCR fingerprinting, RAPD, RFLP, AFLP, MLST, así como la secuenciación de ciertos genes conservados propios del microorganismo (103).

### **1.10 Susceptibilidad antifúngica y tratamiento**

Actualmente se utiliza la evaluación de la susceptibilidad antifúngica mediante la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) siguiendo métodos estandarizados por instituciones acreditadas como es el caso del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) anteriormente conocido como *National Commitee for Clinical Standards* (NCCLS). Existen varias guías editadas por el CLSI en donde se dictan las pautas para realizar la prueba de macro y microdilución en caldo. El documento recientemente publicado es el M27-A3 (104).

Los antifúngicos utilizados para el tratamiento de la criptococosis son la ANB desoxicolato o asociada a lípidos solo o en combinación con 5-fluorocitosina (5FC)

(105). También se pueden utilizar antifúngicos triazólicos (106) tales como fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), éste se ha utilizado como terapia para evitar recidivas (107). Voriconazol (VRC) y posaconazol (PSC) se utilizan en enfermos inmunocompetentes como terapia alternativa o complementaria o para profilaxis secundaria (108).

La epidemiología de la resistencia antifúngica en la patogenicidad de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* es un proceso dinámico que difiere considerablemente de acuerdo a la situación de la atención de la salud, especialmente la dedicada al VIH y el SIDA, dependiendo de cada región. En países industrializados la creación del efecto acumulativo de regímenes de TARAAs incluyen el tratamiento inicial de la meningitis criptocócica con anfotericina B y 5-fluorocitosina seguido de fluconazol y el mantenimiento de la terapia profiláctica, los resultados en un perfil de sensibilidad antifúngica para el complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*, aumenta la susceptibilidad a fluconazol, así como a la actividad sostenida de la anfotericina B y voriconazol (Tabla 2 y 3).

La situación en muchos países en desarrollo es muy diferente, donde la falta de atención de apoyo con el VIH conduce al retraso en el diagnóstico de la infección por el VIH y el acceso deficiente a la TARA, con compromiso inmunológico resultante de una infección frecuente con *C. neoformans*. Los pacientes que sufren de meningitis criptocócica en general, reciben atención médica tardía en el curso de la infección y por lo tanto tienen una carga muy alta del organismo. La terapia primaria antifúngica en estas regiones está limitada a la administración de fluconazol, a menudo a dosis inadecuadas para el tratamiento de enfermedades del SNC.

Uno de los trabajos de susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* mas importantes fue reportado por Pfaller y colaboradores en donde incluyeron un total de 1,811 aislamientos clínicos de *C. neoformans* recolectados en 100 hospitales distribuidos a nivel mundial; África (395 aislamientos), Europa (102 aislamientos), América Latina (82 aislamientos), Asia (50 aislados) y América del Norte (1,182 aislamientos). De manera global, el 99% de los aislamientos fueron susceptibles a ANB independiente de la región geográfica, solo el 44% fue susceptible a 5FC y 83% para el FLC. Haciendo énfasis en América del Norte donde los aislamientos de *C. neoformans* fueron menos susceptibles a 5FC y FLC en comparación con otras regiones geográficas. La razón de esta variabilidad de desconoce, sin embargo, es posible atribuirla a la mayor accesibilidad a estos dos antifúngicos en esta región en comparación con otras regiones. Además en este mismo estudio también se pudo observar que los resultados de susceptibilidad para 5FC y FLC presentaron variación en función con el tiempo, a diferencia de la susceptibilidad de ANB que se mantuvo a través del tiempo.

**Tabla 2.** Susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* y *C. gattii* (115).

Organismo	Antifúngico	No. de aislamientos	CMI (µg/ml) <sup>a</sup>			% por categoría <sup>b</sup>	
			Rango	50%	90%	S	R
<i>C. neoformans</i>	Anfotericina B	1811	0.25-2	1	1	99	1
	Fluconazol	1811	0.12->64	4	16	83	1
	Voriconazol	1800	0.007-4	0.06	0.25	99	1
<i>C. gattii</i>	Anfotericina B	42	0.12-1	0.25	0.25	100	0
	Fluconazol	42	0.5-32	2	8	NA	0
	Voriconazol	42	<0.015-0.5	0.12	0.25	100	0

<sup>a</sup> CMI en la cual el 50% y 90% de los aislamientos fueron inhibidos.

<sup>b</sup> Puntos de corte descritos por el documento M27-S3 del CLSI; S, susceptible; R, resistente.

**Tabla 3.** Variación temporal y geográfica en la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans*.

Lugar	Periodo de tiempo	Antifúngico	No. de aislamientos	CMI (µg/ml) <sup>a</sup>			% por categoría <sup>b</sup>	
				Rango	50%	90%	S	R
Cryptococcus neoformans								
Estados Unidos	1990-1999	Anfotericina B	213	≤0.12-≥64	2	8	93	0.9
		Fluconazol	213	≤0.12-≥32	≤0.12	≤0.12	93	NA
Reino Unido	1994-1996	Fluconazol	143	≤0.25-≥64	8	32	NA	NA
África	1194-2000	Anfotericina B	52	<0.002-0.09	0.006	0.012	100	0
		Fluconazol	52	0.03-≥256	8	32	50	5.8
		Voriconazol	52	0.004	0.12	0.25	100	0
Taiwán	2003	Anfotericina B	70	0.12-2	0.5	1	97.1	2.9
		Fluconazol	70	0.12-16	2	8	96	0
		Voriconazol	70	0.12-0.5	0.12	0.12	100	0
España	1995-2004	Anfotericina B	317	0.03-2	0.25	1	94.7	5.3
		Fluconazol	317	0.12-32	4	16	53.4	0
		Voriconazol	317	0.015-4	0.12	0.5	99.1	0.9
Francia	1997-2001	Anfotericina B	94	0.03-2	0.25	1	95.7	4.3
		Fluconazol	94	0.12-4	1	2	100	0
América Latina	2001	Anfotericina B	89	NA	0.12	0.5	100	0
		Fluconazol	89	NA	4	8	99	NA
Cryptococcus gattii								
África	2002-2004	Fluconazol	41	0.51-8	1	4	100	0
		Voriconazol	41	0.015-0.12	0.03	0.06	100	0
Brasil	NA	Anfotericina B	57	0.25-2	0.59	1	96.5	3.5
		Fluconazol	57	1-≥64	9.54	32	NA	NA
		Voriconazol	57	<0.03-1	0.15	0.25	100	0
América Latina	2001	Anfotericina B	11	NA	0.25	0.5	100	0
		Fluconazol	11	NA	8	16	73	NA

<sup>a</sup> CMI en la cual el 50% y 90% de los aislamientos fueron inhibidos.

<sup>b</sup> Puntos de corte descritos por el documento M27-S3 del CLSI; S, susceptible; R, resistente. NA, datos no disponibles.

### **1.10.1 Anfotericina B**

La ANB es una molécula poliénica la cual se administra por vía endovenosa en dilución con suero glucosado. Es ideal como tratamiento de elección ya que tiene actividad fungicida y a pesar de que no atraviesa bien la barrera hematoencefálica es muy eficaz para combatir esta micosis. Su administración produce numerosos efectos secundarios producto de su alta nefrotoxicidad ocasionando un aumento de los niveles de creatinina (109). También puede producir fiebre, escalofríos, shock e hipertensión.

Para reducir su toxicidad se ha incorporado la ANB a cápsulas formadas por liposomas, también se han producido asociaciones con otras sustancias lipídicas. La eficacia terapéutica de estas formulaciones ha demostrado que se puede elevar la dosis de ANB manteniendo una buena tolerancia. Sin embargo, su uso es limitado en ciertos países donde la criptococosis es endémica debido al elevado costo de los derivados lipídicos (110, 111).

### **1.10.2 Fluconazol**

El FLC es un agente hidrosoluble por lo tanto se une de forma débil a las proteínas plasmáticas, una de las ventajas en cuanto a este antifúngico es la penetración de los líquidos biológicos de todos los niveles. La alteración de la membrana de la célula fúngica por inhibición de la síntesis del ergosterol es el mecanismo de acción de los azoles. En la vía enzimática del ergosterol por acción de los antifúngicos azólicos se bloquea la producción del lanosterol ocasionando que se incremente su concentración. Al no producirse la demetilación del lanosterol por acción de la enzima citocromo P450 14  $\alpha$ -demetilasa, los grupos intermediarios 14-metilados son tóxicos y responsables de la inhibición del crecimiento fúngico (112).

### **1.7.3 Voriconazol**

El VRC no forma parte de la terapia antifúngica de elección del tratamiento de la criptococosis. A pesar de ello se han realizado estudios para evaluar la eficacia de esta droga en modelos murinos con meningitis criptocócica demostrando que *in vivo* tiene excelente actividad antifúngica con buenos niveles en el LCR y con evidencia de buena respuesta clínica (113).



## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICACIÓN**

La criptococcosis es una micosis oportunista que afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos y es la primera causa de meningitis fúngica a nivel mundial en esta población.

En México se dispone de escasa información referente a la epidemiología molecular del agente causal de la criptococcosis, así como de estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos convencionales frente a las diferentes especies que conforman el complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Particularmente, en el noreste del país se carece de información al respecto.

## CAPÍTULO 3

### OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Caracterizar el fenotipo y genotipo de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* en aislamientos clínicos del noreste de México.

#### 3.2 Objetivos específicos

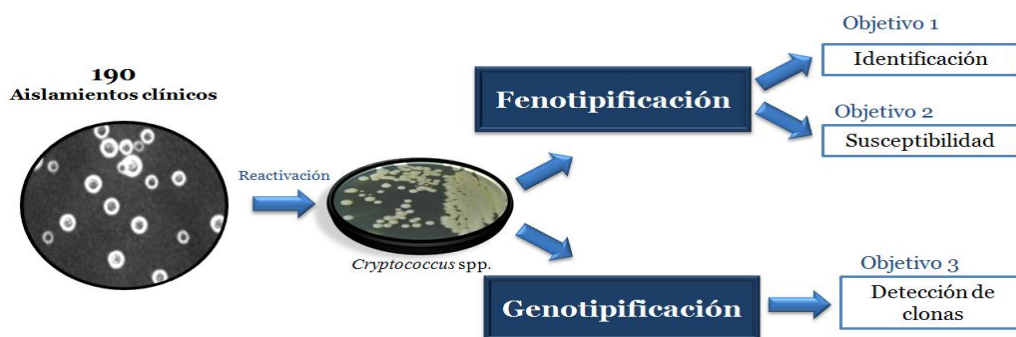
1. Identificar aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* a nivel de especie.
2. Determinar los perfiles de susceptibilidad frente a los diversos antifúngicos.
3. Determinar la presencia de clonas de las especies del complejo de *C. neoformans* / *C. gattii* mediante PCR fingerprinting.

## CAPÍTULO 4

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1 Estrategia general

Para dar cumplimiento al objetivo general del trabajo se realizó la siguiente estrategia general. A partir de una colección de 190 aislamientos de origen clínico identificados mediante su morfología microscópica con el examen directo en fresco en tinta china. Se sometieron a reactivación metabólica y posterior a ello se caracterizaron fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas tales como: prueba de ureasa, asimilación de carbohidratos, producción de melanina y asimilación de glicina para su identificación y se realizó la susceptibilidad frente a distintos antifúngicos: ANB, FLC Y VRC. Se procedió a identificarlos de manera precisa a nivel de genotipo mediante la técnica de PCR fingerprinting, para la detección de clonas.



**Figura 14.** Esquema de la estrategia general.

## 4.2 Identificación a nivel complejo por pruebas bioquímicas.

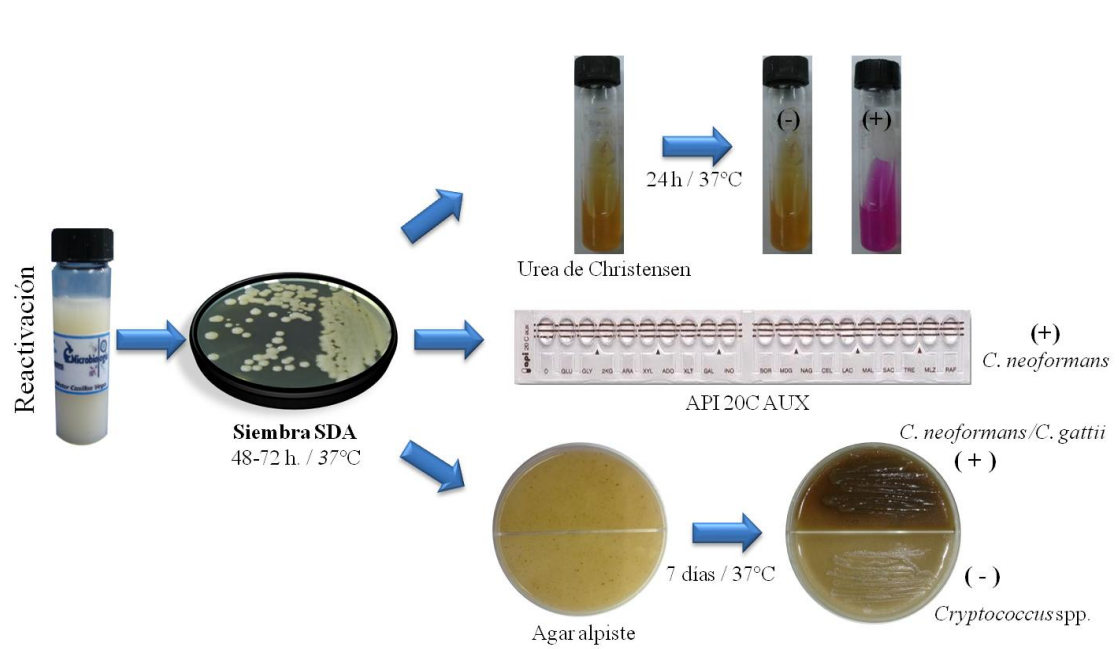
Con el fin de llevar a cabo la identificación a nivel complejo (Fig. 15), a partir de la reactivación de los aislamientos previamente identificados como *C. neoformans*, se sembraron en SDA, el cual se incubó (Incubadora *American Gold Series*, modelo IS-81) a 37°C, durante un período de 48 a 72 h. Posteriormente se realizó la prueba de ureasa, donde a partir de una colonia joven, se inoculó en medio agar urea de Christensen, el cual se incubó a 37°C por un periodo de 24 hrs, transcurrido este tiempo se tomó lectura, si se observó el viraje de color a rosa intenso se interpretó como positiva tras la hidrólisis de urea y negativa si no presentó cambio de color en el indicador. Después se realizó la asimilación de carbohidratos mediante el sistema de API 20 C AUX. El sistema consiste en una galería de 20 microcúpulas, 19 de las cuales poseen diferentes carbohidratos y un testigo, que carece de carbohidrato.

A partir de una suspensión de la levadura joven de 24 h de incubación, se preparó una dilución en solución salina y se ajustó a una turbidez conocida la cual fue transferida a un medio especial de enriquecimiento. De éste, se inocularon las microcúpulas de la galería, la cual se incubó a 30°C por 24 a 72 h. Todas las reacciones fueron comparadas contra el testigo y los resultados fueron leídos y convertidos a un código numérico de seis dígitos con el cual se llevó a cabo la identificación electrónicamente mediante la base de datos. Dando como resultado *C. neoformans* para ambas especies del complejo.

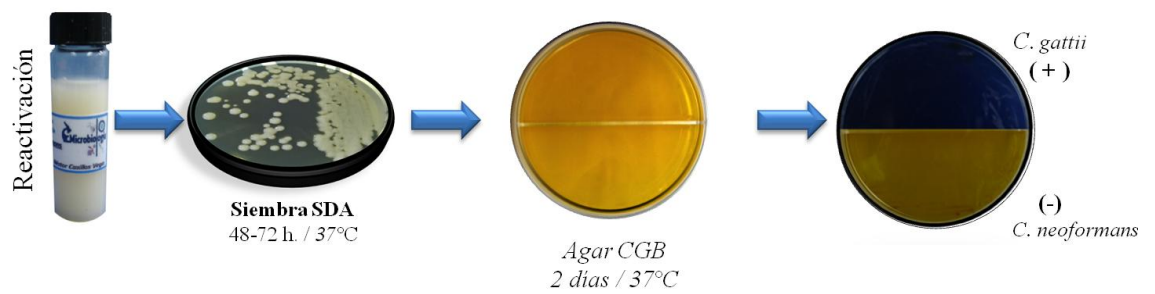
A partir de una colonia joven en SDA se inoculó el agar alpiste negro (Ver Apéndice A) y se incubó durante 7 días a 37°C. La formación de colonias de color café se interpretó como positivo. Se interpretó como negativo por la ausencia de pigmentación en las colonias indicando que correspondería a otra especie del género *Cryptococcus*.

#### **4.3 Identificación a nivel especie por pruebas bioquímicas.**

En la figura 16 se muestra la metodología para la identificación a nivel de especie, se utilizó la asimilación de glicina. A partir de la reactivación de los aislamientos se obtuvo una colonia joven en el SDA, se inoculó y se incubó en el agar CGB, por 48 horas a 37°C. Un resultado positivo indicó la presencia de *C. gattii*. Se determinó por un cambio de color de amarillo a azul. Además es resistente a canavanina; produciendo la alcalinización del medio y la ausencia de viraje se interpretó como un resultado negativo, indicándonos que correspondía a la especie de *Cryptococcus neoformans*.



**Figura 15.** Metodología para la identificación a nivel complejo.



**Figura 16.** Metodología para la identificación a nivel especie.

#### 4.4 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* se efectuaron utilizando el método de macrodilución en tubo, de acuerdo con los lineamientos estipulados en el documento M27-A3 del CLSI (104).

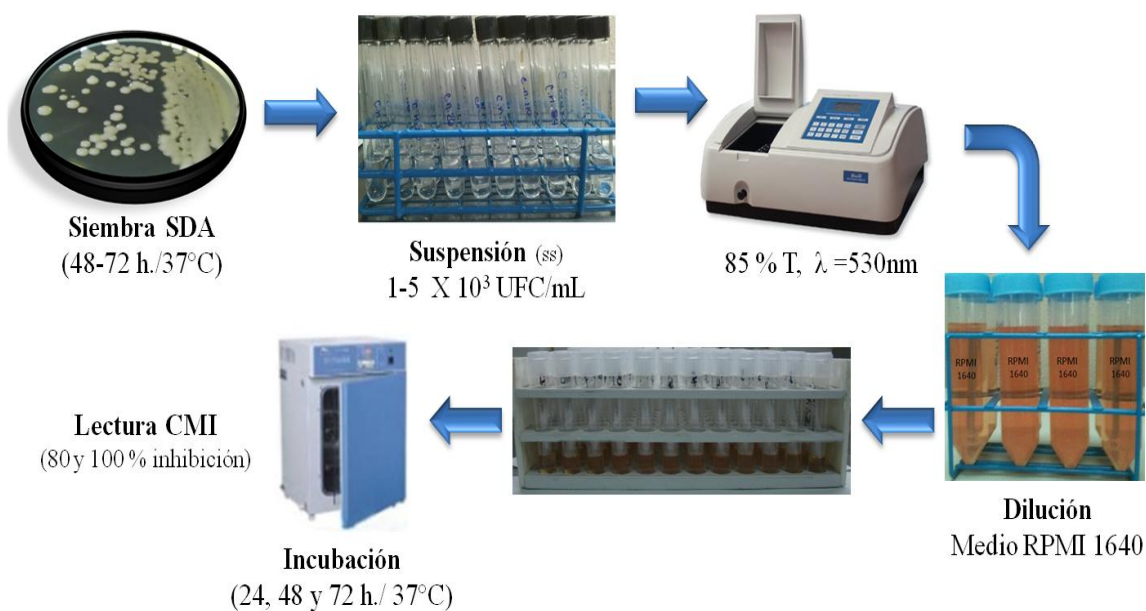
Los antifúngicos utilizados en el trabajo fueron obtenidos de sus respectivas compañías farmacéuticas, siendo los siguientes: FLC y VRC (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, New York, USA), ANB (Sigma-Tau PharmaSource, Inc., Indianapolis, USA). Se efectuaron una serie de diluciones de los antifúngicos utilizando agua destilada estéril como disolvente, se colocaron 0.1 mL de cada concentración en tubos de poliestireno de 5 mL de fondo redondo con tapón de doble tope estériles. El rango de concentraciones que se manejó para los antifúngicos utilizados fue el siguiente: 0.125-64 µg/mL para el FLC y 0.03-16 µg/mL para VRC y ANB.

En la figura 17 se observa la metodología; para la preparación del inóculo los aislamientos se sembraron en SDA y se incubaron a 37°C por 48 horas, se tomaron 5 colonias aisladas y se suspendieron en solución salina al 0.85% estéril. La concentración de la suspensión celular resultante se ajustó a una transmitancia del 85%  $\pm 1$  (Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340) a una longitud de onda de 530 nm, proporcionando una concentración de inóculo de  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente se preparó una dilución 1:100 con solución salina al 0.85% estéril y la suspensión del inóculo previamente ajustado (9.9 mL de solución salina + 0.1 mL del inóculo) y posterior a esta dilución, se realizó una dilución 1:20 con el medio RPMI 1640 (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, E.U.A.) estéril en tubos Falcon estériles de 50 mL (47.5

mL del medio RPMI 1640 + 2.5 mL de la dilución 1:100). Se agregó 0.9 mL de esta dilución a los tubos con las diferentes concentraciones del fármaco, se incluyó un tubo control libre de fármaco, así como un tubo control que contenía sólo el inóculo. Los tubos se incubaron a 37°C por un periodo de 24, 48 y 72 horas y se efectuaron lecturas para el 80% y 100% de inhibición del crecimiento microbiano.

Para el control de calidad se emplearon las cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Se determinó el rango, media geométrica (MG), CMI<sub>50%</sub> y CMI<sub>90%</sub> de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad.



**Figura 17.** Metodología para los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro*.



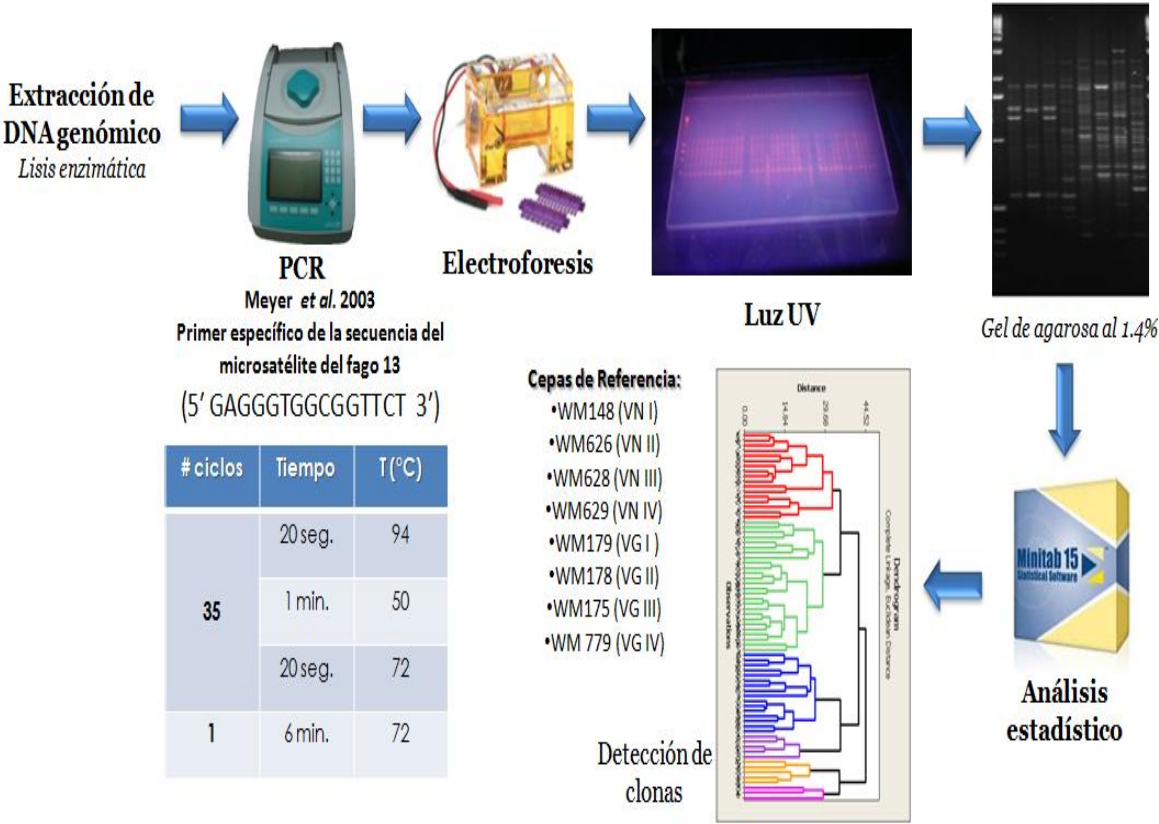
## 4.5 Identificación molecular

Para la genotipificación de los aislamientos, se llevó a cabo la obtención del material genético de los aislamientos y se extrajo DNA genómico mediante el método de lisis enzimática y CTAB, para lo cual se sembraron en placas de SDA, se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. Posterior a ello, se ajustó una suspensión celular de los aislamientos a una turbidez comparándola con el tubo número 1 del nefelómetro de McFarland ( $3 \times 10^8$  células/mL). Se tomó 1 mL de la suspensión y se centrifugó por 5 minutos a 14, 000 r.p.m. (Centrífuga *Labnet*, modelo Hermle Z 233 MK-2). Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el paquete celular en 100 µL de agua destilada estéril. Posterior a ello se realizaron 5 repeticiones de choques térmicos llevando de -70° C a 100° C (Baño de agua *LAB-LINE*, modelo IV), cada episodio constó de 5 minutos. Se realizaron 3 lavados con etanol al 70% (1000 µl), se centrifugó por 8 minutos a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el etanol a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se procedió a eliminar el medio de cultivo para trabajar únicamente con la masa fúngica a la cual se le agregaron 200 µL de µl de solución de lisis enzimática (Tris-HCl 20 mM (pH 8), EDTA 2mM, Tritón 1.2%, lisozima 20 mg/mL) se incubó por 24 horas a 37 °C. Se llevó a 500 µl con TE-1X, 30 µl de SDS al 10%, 3 µl de Proteinasa K 10mg/mL, y se incubó por una hora a 55 °C, pasado el tiempo se agregaron 100 µl NaCl 5M y 80 µl de CTAB/NaCl y se incubó por una hora a 65°C. Posteriormente se realizaron dos extracciones con SEVAG (cloroformo – alcohol isoamílico 24:1) y fenol saturado. Se separó la fase acuosa y se precipitó el DNA agregando 0.6 volumen de alcohol isopropílico y 10% del volumen total de acetato de sodio 3M (pH  $5.3 \pm 1$ ) y se colocó a -20 °C (Congelador SANYO Biomedical Freezer)

por toda la noche. Se centrifugó 8 minutos a 14 000 rpm y se lavó tres veces la pastilla de DNA con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente toda la noche, se agregaron 100 µl de TE-1X y se disolvió por calentamiento a 55°C por 15 minutos. Las muestras de DNA obtenidas se almacenaron en congelación -20°C hasta su utilización.

Para la amplificación del DNA se utilizó la técnica molecular PCR fingerprinting empleando el primer específico de la secuencia del microsatélite del fago 13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') reportado previamente en el 2003 por Meyer y colaboradores (55, 56). A partir de los stocks se efectuaron diluciones 1:10 con agua estéril grado biología molecular (Mediatech, Inc., Manassas, VA, E.U.A.) para utilizarse posteriormente como soluciones de trabajo. Las condiciones de amplificación de la PCR fingerprinting fueron las siguientes: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, alineamiento a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 20 seg. La extensión final fue a 72°C por 6 min (Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation Px2). La mezcla de reacción de volumen final de 25 µL consistió de 5 µL de DNA; buffer de reacción NH<sub>4</sub> pH 8.8 (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), compuesto de: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, Tris-HCl 67 mM y Tween-20 0.01%; MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.); dNTP's 0.8 mM (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), 1.5 µL de acetato de magnesio 3mM, 30ng del primer M13 y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Posterior a ello, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.4% (Cámara de electroforesis Thermo Maxicel Primo EC 340), el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/mL) y se reveló en un transiluminador UV (Fotodocumentador UVP Bioimaging Systems).

Posterior a ello se realizó el análisis estadístico mediante el software Minitab 15 para la obtención de dendogramas y se detectaron las diferentes clonas de los aislamientos (Fig. 18)



**Figura 18.** Metodología para la identificación molecular.

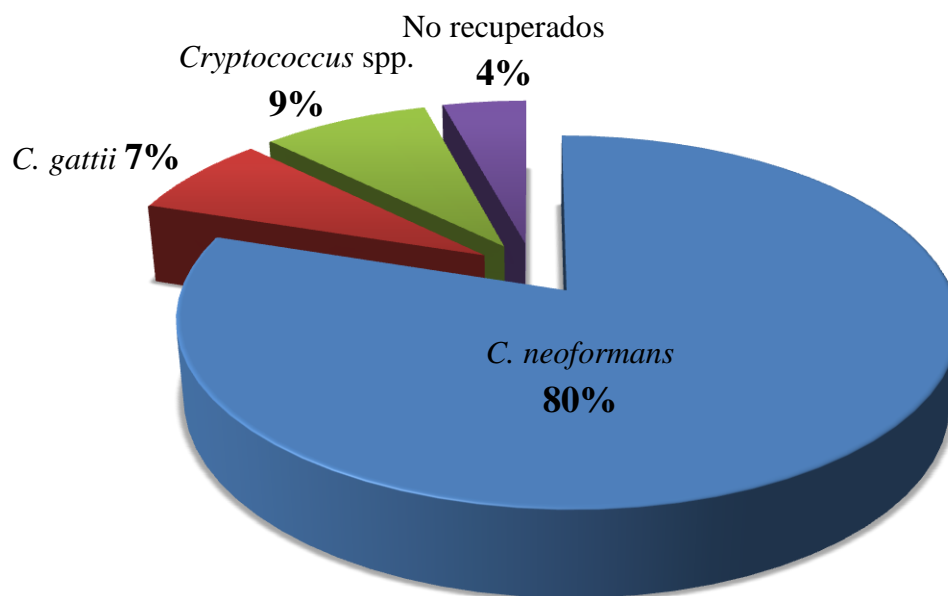
## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Identificación a nivel género y especie por pruebas bioquímicas

Los aislamientos fueron enviados al Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los cuales fueron identificados convencionalmente mediante su morfología microscópica en el examen directo en fresco en tinta china y se mantuvieron en suspensión en agua estéril a temperatura ambiente hasta su reactivación.

En la figura 19 se muestra que de los 190 aislamientos incluidos, el 96% fueron recuperados, los cuales se sometieron a pruebas de morfología macroscópica y microscópica y se les realizaron las pruebas bioquímicas: ureasa en el medio urea de Christensen, la cual fue positiva en el 100% de los aislamientos; la asimilación de carbohidratos y la producción de melanina solo fueron positivas para 166 aislamientos por lo que fueron identificados como del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gatti*. El medio CGB se utilizó para diferenciar entre las especies del complejo y el 80% de los aislamientos correspondió a la especie de *C. neoformans* y el 7% a la especie de *C. gattii*.



**Figura 19.** Distribución de los aislamientos identificados a nivel especie.

### 5.1.1 Procedencia de los aislamientos y población de estudio

Los 166 aislamientos que correspondieron al complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, fueron recolectados de 1995 a 2011 en 6 diferentes hospitales en el noreste de México, entre los cuales destaca el Hospital Universitario “José Eleuterio González” con un total de 132 aislamientos representando el 77% del total de las muestras, el Hospital 25 del IMSS con un total de 12 aislamientos (7%), el Hospital San José Monterrey con 8 aislamientos (5%), el Hospital Christus Muguerza con 8 aislamientos (5%), el Hospital Oca Monterrey con un total de 4 aislamientos (2%) y el Hospital Regional ISSSTE con 2 aislamientos (1%). Todos los aislamientos analizados fueron provenientes de líquidos estériles, de los cuales 159 (96%) correspondieron a líquido cefalorraquídeo y 7 (4%) a sangre. En cuanto a la población de pacientes un 73% correspondió a género masculino y 27% fue género femenino, con una proporción 1:3. Las edades de los pacientes variaron en un rango de los 16 hasta 65 años.

## 5.2 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los 166 aislamientos clínicos del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, analizados por el método de macrodilución en tubo. Los datos se presentan como rango, media geométrica y CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) necesaria para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos ensayados. 100% de los aislamientos de *C. neoformans*, así mismo el 100% correspondientes a *C. gattii* fueron susceptibles, a los diferentes fármacos probados, los cuales fueron ANB, FLC y VRC.

Un aislamiento es considerado resistente a ANB y VRC con una CMI  $\geq$  a 16  $\mu\text{g/mL}$ , para FLC con una CMI  $\geq$  a 64  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 4.** Susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *C. neoformans* y *C. gattii*.

Organismo (166)	Antifúngico	Rango	MG <sup>a</sup>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
				50 % <sup>b</sup>	90 % <sup>c</sup>
<i>C. neoformans</i> (153)	Anfotericina B	0.125 - 1	0.343	0.25	1
	Fluconazol	0.5-4	1.335	2	2
	Voriconazol	0.03-0.125	0.061	0.06	0.125
<i>C. gattii</i> (13)	Anfotericina B	0.125 - 1	0.356	0.25	1
	Fluconazol	0.5-4	1.31	1	2
	Voriconazol	0.03-0.125	0.062	0.06	0.125

<sup>a</sup> Media Geométrica

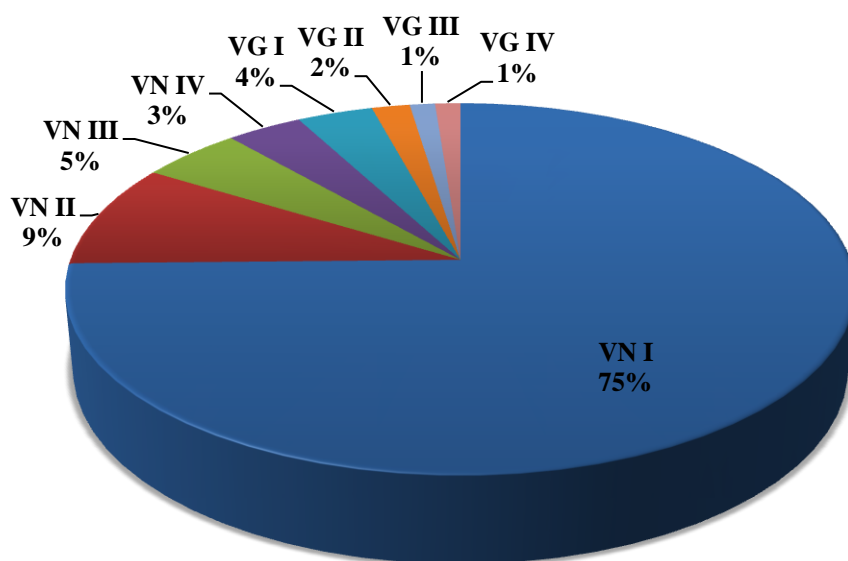
<sup>b</sup> CMI en la cual el 50% de los aislamientos fueron inhibidos

<sup>c</sup> CMI en la cual el 90% de los aislamientos fueron inhibidos

### 5.3 Identificación molecular

De los 166 aislamientos analizados por PCR fingerprinting, se encontraron los ocho tipos moleculares que conforman el complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* (Fig. 20). La distribución de los genotipos fue la siguiente: 124 (79%) aislamientos fueron VNI; 15 (9%) VNII; 8 (5%) VNIII; 6 (3%) VN IV; 6 (4%) VGI; 3 (2%) VG II; 2 (1%) VG III; 2 (1%) VGIV. 153 (92%) aislamientos correspondieron a *C. neoformans* y 13 (8%) de los aislamientos correspondieron a *C. gattii*.

En la tabla 5 se muestran las clonas y los patrones de restricción de cada genotipo de ambas especies. En cuanto a *C. neoformans*, el genotipo VNI fue el que presentó mayor frecuencia ya que mostró 23 clonas, compuestas entre 2 y hasta 38 aislamientos. El genotipo VNII presentó 6 clonas, seguido por los genotipos VNIII y VNIV con un total de 2 clonas cada uno. Respecto a los clonas de la especie *C. gattii*; solo los genotipos VGI y VGII presentaron clonas, a diferencia de los genotipos VGIII y VGIV los cuales no presentaron clonas. Para *C. neoformans* el % de similitud de los aislamientos estuvo entre 72 y 100% y para *C. gattii* fue entre 54 y 100% (Fig. 21).

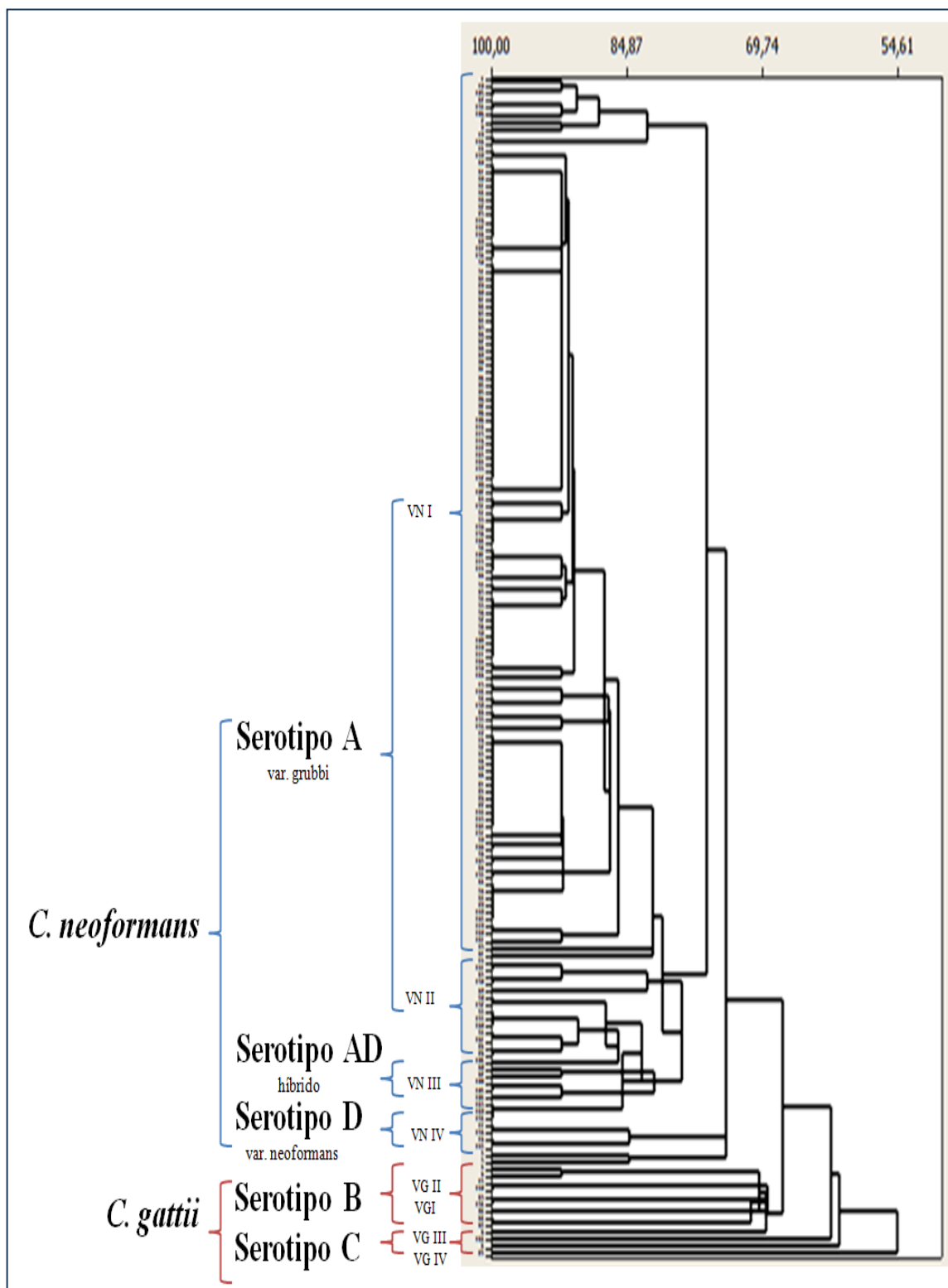


**Figura 20.** Distribución de los ocho tipos moleculares identificados en el noreste de México.

**Tabla 5.** Genotipificación de los aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*.

Genotipo	No. (%) de aislamientos	Clonas	Patrón de restricción
VN I	124 (75)	23	
VN II	15 (9)	6	
VN III	8 (5)	2	
VN IV	6 (3)	2	
VG I	6 (4)	1	
VG II	3 (2)	1	
VG III	2 (1)	0	
VG IV	2 (1)	0	





**Figura 21.** Dendrograma de los 166 aislamientos clínicos del noreste de México obtenido por PCR-fingerprinting con el primer M13.

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN

La criptococosis es una micosis tradicionalmente considerada como oportunista cuya prevalencia se ha incrementado en los últimos años, así como una serie de estudios relacionados con la identificación y genotipificación de las levaduras pertenecientes a las especies del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* alrededor del mundo (1, 70, 101).

De acuerdo a los reportes de estudios previos respecto a la identificación bioquímica del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, se decidió que los aislamientos incluidos en este trabajo, posterior a una evaluación de la morfología microscópica y macroscópica, fueran sometidos a la prueba de ureasa como identificación preliminar de género, ya que este complejo produce dicha enzima y es por esto que un resultado positivo es sugestivo del género *Cryptococcus*. Debido a que el total de los aislamientos fueron positivos para la producción de ureasa, se decidió incluir todos los aislamientos en las pruebas de producción de melanina (101) y asimilación de carbohidratos (98), ya que en base a lo reportado en investigaciones previas, estas pruebas son las más exactas en cuanto a la identificación bioquímica a nivel complejo. Estas pruebas brindan resultados equiparables con los obtenidos mediante técnicas moleculares (67, 95, 103). En este estudio el total de los aislamientos recuperados fueron positivos para la producción de ureasa y 91.2% (166/182) fueron positivos para la producción de melanina y asimilación de carbohidratos, correspondiendo a las especies del complejo.

En este estudio, se decidió incluir la prueba de utilización de la glicina y de canavanina, debido a que permiten la discriminación entre las especies que constituyen el complejo, y además presentan las ventajas de rapidez y bajo costo (114).

La mayoría de los estudios realizados en cuanto a la susceptibilidad de las especies del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* se han dedicado a estudiar el efecto del fluconazol. En nuestro trabajo los aislamientos fueron 100% susceptibles a este fármaco y se observó similitud en lo previamente reportado en un estudio realizado en la ciudad de México donde incluyeron un total de 72 aislamientos de los cuales fueron en su totalidad susceptibles al fluconazol (69). Otro estudio se realizó recientemente en el cual se incluyeron 134 sitios en 39 países, lo cuales abarcaron del año 2001 al 2007, con un total de 2,711 aislamientos de *C. neoformans*, se encontró que la resistencia a fluconazol fue menor en Europa y América del Norte, en comparación a la observada en la región de Asia-Pacífico, África, Oriente Medio y regiones de América (115).

Los estudios de los aislamientos clínicos de *C. neoformans* de Brandt (116)(17), Datta (117), Klepser (118), Yildiran (119) y Pfaller (115, 120) proporcionan datos acerca de la susceptibilidad generados por CLSI mediante las concentraciones mínimas inhibitorias, indicando que la resistencia *in vitro* a fluconazol, así como a anfotericina B y voriconazol sigue siendo poco común y no ha aumentado con el tiempo. Otro análisis de las tendencias en cuanto a la susceptibilidad a fluconazol realizado en Estados Unidos en el periodo entre 1992 y 1998 muestra que el perfil de susceptibilidad ha mejorado desde la introducción de la TARAA (119).

Por el contrario, los informes de Chandenier y colaboradores en Camboya (121); Bicanic y colaboradores en África(122, 123) y Perkins en España (124) indican que estudios recientes, ciertos aislamientos muestran menor susceptibilidad a fluconazol y otros azoles. En un informe de Bicanic y colaboradores (125), el 70% de los aislados de pacientes con una recaída después del tratamiento clínico de la meningitis criptocócica con fluconazol como terapia de primera línea mostraron resistencia reportándose una CMI mayor o igual a 64 µg/ml.

Otros antifúngicos probado en los aislamientos de este estudio fueron la anfotericina B y el voriconazol siendo susceptibles en el 100% en ambos casos. Diversos estudios han demostrado que la anfotericina B, así como los triazoles más recientes como es el caso del voriconazol, tienen una potente actividad contra *C. neoformans*, con más del 99% de los aislamientos los cuales mostraron una CMI menor o igual a 1, con independencia del origen geográfico de los aislados.

En el presente trabajo no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones mínimas inhibitorias entre ambas especies del complejo *C. neoformans*/*C. gattii*. Existen pocos estudios (126, 127) que muestran diferencias para *C. gattii* en comparación con *C. neoformans*. En la actualidad la resistencia a los antifúngicos no parece plantear un problema el tratamiento de la criptococosis. Morgan y colaboradores comparan aislamientos estudiados en el 2006 en África con aislamientos de Bicanic y colaboradores (59, 122) obtenidos en el mismo período de tiempo, dando como resultado a la comparación, que el total de los aislamientos son susceptibles a fluconazol (59).

Un gran número de técnicas de tipificación molecular se ha aplicado en los últimos años para discriminar entre los aislados individuales que habían sido indistinguibles utilizando técnicas convencionales (128) y así obtener más conocimientos sobre la epidemiología y la población de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Las técnicas empleadas para investigar el genotipo de las especies del complejo son la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) (129, 130), el cariotipo electroforético (131), Southern blot (132), RAPD (133), MLST (134), MLMT (135, 136) y PCR fingerprinting (56, 58, 60, 137). En este trabajo se realizó la técnica de PCR fingerprinting con el primer específico de la secuencia del microsatélite del fago 13 (138, 139) debido a que se considera una de las técnicas moleculares más rápidas para la detección de patrones de bandas. Esta técnica se puede realizar para confirmar un determinado tipo molecular en los casos de enfermedad esporádica o durante los estudios de epidemiología molecular (68, 140). La cual se basa en la amplificación de secuencias de ADN, flanqueada por unidades de repetición. La técnica utiliza cebadores individuales específicos de microsatélites de ADN o repeticiones de mini satélites, que fueron diseñados originalmente como sondas de hibridación de huellas genéticas de ADN, aplicadas a otros hongos (141).

Para la estandarización de la prueba se emplearon las cepas de referencia de cada genotipo proporcionadas por Meyer. En el presente trabajo se encontraron los 8 genotipos del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*. Estudios previos utilizaron esta técnica molecular en la Universidad de Sydney analizando más de 400 aislamientos clínicos y ambientales obtenidos de Argentina, Australia, Bélgica, Brasil, Alemania, Italia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea, Sudáfrica, Tailandia, Uganda y los Estados Unidos en ocho

tipos principales moleculares, VNI y VNII (serotipo A), VNIII (serotipo AD), VNIV (serotipo D), VGI, VGII, VGIII y VGIV (serotipos B y C) (142, 143). El presente estudio concuerda con la mayoría de los resultados publicados previamente, en los cuales se muestra que hay un genotipo predominante para cada una de estas dos especies patógenas. En cuanto a la especie de *C. neoformans* el VNI fue el tipo más frecuente (75%), como previamente se había mencionado seguido por VNII (9%), los cuales corresponden a la variedad *grubbi*, como se ha reportado a nivel mundial. Se encontraron 8 aislamientos del patrón VNIII correspondiente al serotipo híbrido AD, el cual se relaciona principalmente con *C. neoformans* variedad *grubbi* y variedad *neoformans*. Así que el origen de la elevada prevalencia de los genotipos híbridos podría explicarse por la coexistencia de las dos formas haploides (Serotipos A y D) en nuestra área geográfica. En este estudio se encontró el patrón VNIV, el cual se presenta con poca frecuencia en diferentes países de América Latina, a diferencia de la alta presencia de serotipo D en países europeos como Francia e Italia (144). Este hecho se puede deber a la diseminación de los aislamientos debido a las palomas (*Columba livia*) como previamente lo sugirieron Franzcort y colaboradores (145). También se cree que el serotipo D se originó en el sur de Europa y norte de África y se ha dispersado en todo el mundo por los viajes de los seres humanos (146).

En el presente estudio se encontraron aislamientos de *C. gattii* confirmando que esta especie no solo se limita a zonas con clima tropical y subtropical y que pueden encontrarse en suelo árido y semiárido como el de nuestra región geográfica (55). Se cree que el noreste de México pudo haber contribuido como eslabón entre América del Sur y el brote en Vancouver (147, 148).

La mayoría de los aislamientos de criptococosis en este estudio se recuperaron de pacientes cuyo principal factor de riesgo era la infección por VIH. De estos aislamientos correspondieron al tipo molecular VNI, de acuerdo con los resultados anteriores, mostrando que los aislados de este tipo molecular son la principal fuente de infección en los pacientes con VIH en todo el mundo (62, 142). A diferencia en el grupo de los aislados obtenidos de pacientes sin factores de riesgo conocidos, la mayoría de los aislamientos fueron *C. gattii*. Este hallazgo apoya a que la especie *C. gattii* infecta principalmente a pacientes inmunocompetentes como Chen y colaboradores lo habían encontrado en la investigación de los aislamientos de Australia (58)(30). Estos autores propusieron que la población que vive en zonas rurales del territorio norte de Australia tiene un mayor riesgo de criptococosis porque viven en las proximidades del huésped potencial natural de esta especie, los árboles de eucalipto (45). En la ciudad de México se llevó a cabo un estudio donde se aisló y caracterizó la presencia de *C. gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus canaldulensis* (149).

Los resultados de este estudio muestran una clonalidad entre los aislamientos obtenidos de 6 diferentes hospitales del noreste de México, de lo que sugiere la propagación clonal de la levadura patógena en el noreste del país. En el presente trabajo los aislamientos presentaron un porcentaje mayor de 72% de similitud entre los aislamientos en cuanto a la especie de *C. neoformans* y para la especie de *C. gattii* aproximadamente un 50%, la similitud general entre los aislamientos de las especies del complejo. El genotipo VNI con el genotipo VNII ambos correspondientes a la variedad *grubii* presentaron porcentaje de similitud fue de 82% aproximadamente siendo el más alto en cuanto a los genotipos, lo cual sugiere que estas cepas del noreste son más

variables que los obtenidos en un estudio previo de Franzot y colaboradores (145), en el que se examina un número limitado de aislamientos de Brasil mediante el uso de técnicas moleculares menos discriminatorias (CNRE-1 RFLP y secuenciación URA5). En este mismo estudio la mayor similitud entre genotipos era por arriba del 94% entre los aislamientos de Brasil, sugiriendo una clonalidad superior a la observada en los aislamientos obtenidos de nuestro estudio.



## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

1. Los aislamientos incluídos en este estudio no presentaron resistencia a los antifúngicos probados: anfotericina B, fluconazol y voriconazol.
2. Se encontraron los 8 diferentes tipos moleculares descritos para el complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*.
3. El 84% de los casos de criptococosis en el noreste de México fueron causados por cepas de *C. neoformans*, con un predominio de *C. neoformans* variedad *grubii*.
4. Se encontró la presencia de *C. gattii* en el noreste de México, confirmando que esta especie no solo se limita a zonas de clima tropical y subtropical.
5. Se obtuvo alta diversidad clonal del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*.
6. Todos los aislamientos correspondientes a la especie de *C. neoformans* se recuperaron de pacientes cuyo principal factor predisponente de riesgo fue la infección por VIH.

## **CAPITULO 8**

### **PERSPECTIVAS**

1. Determinar la posible asociación entre los factores de virulencia que se detectaran en el complejo *C. neoformans* / *C. gattii* y los genotipos observados.
2. Evaluar los pacientes en los cuales se aisló *C. gattii* y determinar si existieron factores predisponentes específicos de los hospederos en los cuales se presentó la infección, determinar los factores ambientales que favorecieron la infección y en la medida de lo posible, las fuentes probables de infección.

## CAPITULO 9

### REFERENCIAS

1. Kwon-Chung, K.J., J.R. Perfect, and S.M. Levitz, *A Chronological History of the International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (ICCC), an Invaluable Forum for Growth of the Cryptococcal Research Field and Clinical Practice*. Mycopathologia, 2011.
2. Buschke, *Über eine durch coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen*. Dtsch Arztebl Int, 1895. **21**: p. 14.
3. Busse, *Über Saccharomyces hominis*. Virchows Arch., 1895. **140**: p. 23-46.
4. Curtis, *Contribution a l'étude de la saccharomycose humaine* Ann. Inst. Pasteur, 1896. **10**: p. 449-468.
5. Vanbreuseghem, R. and M. Takashio, *An atypical strain of Cryptococcus neoformans (San Felice) Vuillemin 1894. II. Cryptococcus neoformans var. gattii var. nov.* Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol, 1970. **50**(6): p. 695-702.
6. Stoddard, J.L., and E. C. Cutler, *Torula infection in man*. . Rockefeller Ins. Med. Res. Monogr., 1916. **6**: p. 1-98.
7. Benham, R.W., *Cryptococci: their identification by morphology and serology*. . J. Infect. Dis., 1935. **57**: p. 255-274.
8. Evans, E.E., *An immunologic comparison of twelve strains of Cryptococcus neoformans*. . Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950. **71**: p. 644-646.

9. Emmons, C.W., *Saprophytic sources of Cryptococcus neoformans associated with the pigeon (Columba livia)*. Am J Hyg, 1955. **62**(3): p. 227-32.
10. Emmons, C.W., *Isolation of Cryptococcus neoformans from soil*. J Bacteriol, 1951. **62**(6): p. 685-90.
11. Staib, F., et al., *Epidemiology of Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia, 1978. **65**(1-3): p. 73-6.
12. Severance, P.J. and C.A. Kauffman, *Diagnosis of cryptococcosis: comparison of various methods to detect Cryptococcus neoformans*. Mykosen, 1983. **26**(1): p. 29-33.
13. Snider, W.D., et al., *Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients*. Ann Neurol, 1983. **14**(4): p. 403-18.
14. Anandi, V., P.G. Babu, and T.J. John, *Infection due to Cryptococcus neoformans of unusual morphology in a patient with AIDS*. Mycoses, 1991. **34**(9-10): p. 377-9.
15. Hull, C.M. and J. Heitman, *Genetics of Cryptococcus neoformans*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 557-615.
16. Boekhout, T., W. Meyer., *Hybrid genotypes in the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001. **147**: p. 891-907.
17. Kwon-Chung, K.J., et al., *Cryptococcosis: clinical and biological aspects*. Med Mycol, 2000. **38 Suppl 1**: p. 205-13.
18. Mitchell, T.G., *Genomic approaches to investigate the pathogenicity of Cryptococcus neoformans* Curr Infect Dis Rep, 2008. **2**: p. 172-179.
19. Kwon-Chung, K.J. and A. Varma, *Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans?* FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 574-87.

20. Lin, X. and J. Heitman, *The biology of the Cryptococcus neoformans species complex*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 69-105.
21. Lin, X., *Cryptococcus neoformans: morphogenesis, infection, and evolution*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(4): p. 401-16.
22. Bennett, J.E., K.J. Kwon-Chung, and T.S. Theodore, *Biochemical differences between serotypes of Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia, 1978. **16**(3): p. 167-74.
23. McFadden, D.C. and A. Casadevall, *Capsule and melanin synthesis in Cryptococcus neoformans*. Med Mycol, 2001. **39 Suppl 1**: p. 19-30.
24. Zaragoza, O., et al., *The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans enlarges by distal growth and is rearranged during budding*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 67-83.
25. Yoneda, A. and T.L. Doering, *Regulation of Cryptococcus neoformans capsule size is mediated at the polymer level*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(3): p. 546-9.
26. Zaragoza, O., et al., *The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol, 2009. **68**: p. 133-216.
27. Casadevall, A., J.N. Steenbergen, and J.D. Nosanchuk, *'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the Cryptococcus neoformans paradigm*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(4): p. 332-7.
28. Kozel, T.R., *Virulence factors of Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol, 1995. **3**(8): p. 295-9.
29. McFadden, D.C., et al., *Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(8): p. 1464-73.
30. Rippon, J.W. and D.P. Varadi, *The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes*. J Invest Dermatol, 1968. **50**(1): p. 54-8.

31. Young, B.J. and T.R. Kozel, *Effects of strain variation, serotype, and structural modification on kinetics for activation and binding of C3 to Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1993. **61**(7): p. 2966-72.
32. Casadevall, A., A.L. Rosas, and J.D. Nosanchuk, *Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(4): p. 354-8.
33. Perfect, J.R., et al., *Cryptococcus neoformans: virulence and host defences*. Med Mycol, 1998. **36 Suppl 1**: p. 79-86.
34. Zimmer, B.L. and G.D. Roberts, *Rapid selective urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol, 1979. **10**(3): p. 380-1.
35. Eisenman, H.C., A. Casadevall, and E.E. McClelland, *New insights on the pathogenesis of invasive Cryptococcus neoformans infection*. Curr Infect Dis Rep, 2007. **9**(6): p. 457-64.
36. Zhu, X., et al., *Laccase of Cryptococcus neoformans is a cell wall-associated virulence factor*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5589-96.
37. Salas, S.D., et al., *Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of Cryptococcus neoformans*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 377-86.
38. Cox, G.M., et al., *Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol, 2001. **39**(1): p. 166-75.
39. van Duin, D., A. Casadevall, and J.D. Nosanchuk, *Melanization of Cryptococcus neoformans and Histoplasma capsulatum reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3394-400.
40. Fonseca, A., J. W. Fell, *Cryptococcus Vullemin*, p. 1665-1740. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell (ed.). The Yeasts: a Taxonomic Study 5th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. , 2010.

41. Kwon-Chung, K.J., *A new genus, filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans*. Mycologia, 1975. **67**(6): p. 1197-200.
42. Kwon-Chung, K.J., *A new species of Filobasidiella, the sexual state of Cryptococcus neoformans B and C serotypes*. Mycologia, 1976. **68**(4): p. 943-6.
43. Khawcharoenporn, T., *Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review*. Infection, 2007. **35**: p. 51-58.
44. Ellis, D. and T. Pfeiffer, *The ecology of Cryptococcus neoformans*. Eur J Epidemiol, 1992. **8**(3): p. 321-5.
45. Ellis, D.H. and T.J. Pfeiffer, *Natural habitat of Cryptococcus neoformans var. gattii*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(7): p. 1642-4.
46. Fisher, D., et al., *Cryptococcus neoformans in tropical northern Australia: predominantly variant gattii with good outcomes*. Aust N Z J Med, 1993. **23**(6): p. 678-82.
47. Bennett, J.E., K.J. Kwon-Chung, and D.H. Howard, *Epidemiologic differences among serotypes of Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol, 1977. **105**(6): p. 582-6.
48. Campbell, G.D., *Primary pulmonary cryptococcosis*. Am Rev Respir Dis, 1966. **94**(2): p. 236-43.
49. Lehmann, P.F., R.J. Morgan, and E.H. Freimer, *Infection with Cryptococcus neoformans var. gattii leading to a pulmonary cryptococcoma and meningitis*. J Infect, 1984. **9**(3): p. 301-6.
50. Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett, *Epidemiologic differences between the two varieties of Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol, 1984. **120**(1): p. 123-30.
51. Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett, *High prevalence of Cryptococcus neoformans var. gattii in tropical and subtropical regions*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1984. **257**(2): p. 213-8.

52. Ellis, D.H. and T.J. Pfeiffer, *Ecology, life cycle, and infectious propagule of Cryptococcus neoformans*. Lancet, 1990. **336**(8720): p. 923-5.
53. Mansour, A., et al., *Cryptococcus neoformans var. gattii meningitis in Egypt: a case report*. East Mediterr Health J, 2006. **12**(1-2): p. 241-4.
54. Alonso, M., et al., *[Disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. Prognostic factors of poor outcome]*. Med Clin (Barc), 1999. **112**(11): p. 401-5.
55. Meyer, W., et al., *Molecular typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans isolates*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(2): p. 189-95.
56. Meyer, W., et al., *Molecular typing of global isolates of Cryptococcus neoformans var. neoformans by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey*. Electrophoresis, 1999. **20**(8): p. 1790-9.
57. Ngamskulrungrroj, P., et al., *Genetic diversity of the Cryptococcus species complex suggests that Cryptococcus gattii deserves to have varieties*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5862.
58. Chen, S., et al., *Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(2): p. 499-508.
59. Morgan, J., et al., *Cryptococcus gattii infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(8): p. 1077-80.
60. Casali, A.K., et al., *Molecular typing of clinical and environmental Cryptococcus neoformans isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul*. FEMS Yeast Res, 2003. **3**(4): p. 405-15.



61. Escandon, P., et al., *Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the Cryptococcus neoformans species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 625-35.
62. Igreja, R.P., et al., *Molecular epidemiology of Cryptococcus neoformans isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro*. Med Mycol, 2004. **42**(3): p. 229-38.
63. Boekhout, T., et al., *Hybrid genotypes in the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 4): p. 891-907.
64. Chen, J., et al., *Cryptococcus neoformans strains and infection in apparently immunocompetent patients, China*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(5): p. 755-62.
65. Kidd, S.E., et al., *A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17258-63.
66. Cogliati, M., et al., *Cryptococcus gattii serotype-C strains isolated in Bangalore, Karnataka, India*. Mycoses, 2011.
67. Feng, X., et al., *Simultaneous identification of molecular and mating types within the Cryptococcus species complex by PCR-RFLP analysis*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 12): p. 1481-90.
68. Viviani, M.A., et al., *Molecular analysis of 311 Cryptococcus neoformans isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 614-9.
69. Olivares, L.R., et al., *Genotyping of Mexican Cryptococcus neoformans and C. gattii isolates by PCR-fingerprinting*. Med Mycol, 2009. **47**(7): p. 713-21.
70. Chayakulkeeree, M. and J.R. Perfect, *Cryptococcosis*. Infect Dis Clin North Am, 2006. **20**(3): p. 507-44, v-vi.

71. Viciana, P., et al., *[Prevention of opportunistic infections in the protease inhibitor era]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 1998. **16 Suppl 1**: p. 1-10.
72. Cameron, M.L., et al., *Manifestations of pulmonary cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. Rev Infect Dis, 1991. **13**(1): p. 64-7.
73. McDonnell, J.M. and G.M. Hutchins, *Pulmonary cryptococcosis*. Hum Pathol, 1985. **16**(2): p. 121-8.
74. Van Tongeren, L., T. Shaipanich, and J.A. Fleetham, *Coinfection with Cryptococcus gattii and Mycobacterium tuberculosis in an otherwise healthy 18-year-old woman*. Can Respir J, 2011. **18**(4): p. e62-3.
75. Baddley, J.W., et al., *Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(10): p. 937-43.
76. Goldman, D., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary Cryptococcus neoformans granulomas*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1275-82.
77. Goldman, D., S.C. Lee, and A. Casadevall, *Pathogenesis of pulmonary Cryptococcus neoformans infection in the rat*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 4755-61.
78. Bicanic, T. and T.S. Harrison, *Cryptococcal meningitis*. Br Med Bull, 2004. **72**: p. 99-118.
79. Manoharan, G., et al., *Cryptococcal meningitis among HIV infected patients*. Indian J Med Microbiol, 2001. **19**(3): p. 157-8.
80. Johnson, F.Y. and S. Naraqi, *Manic episode secondary to cryptococcal meningitis in a previously healthy adult*. P N G Med J, 1993. **36**(1): p. 59-62.
81. Steen, B.R., et al., *Cryptococcus neoformans gene expression during experimental cryptococcal meningitis*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(6): p. 1336-49.

82. Wang, Y. and A. Casadevall, *Decreased susceptibility of melanized Cryptococcus neoformans to UV light*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(10): p. 3864-6.
83. Viriyavejakul, P., et al., *Cryptococcal meningitis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35 Suppl 2**: p. 33-8.
84. Saigo, P., et al., *identification of Cryptococcus neoformans in cytologic preparations of cerebrospinal fluid*. Am J Clin Pathol, 1977. **67**(2): p. 141-5.
85. Diaz-Perez, J.A., et al., *[Cryptococcoma in the central nervous system of a non-immunocompromised patient]*. Rev Neurol, 2008. **46**(2): p. 97-101.
86. Vasanthi, S., et al., *Cutaneous cryptococcosis among HIV infected patients*. Indian J Med Microbiol, 2002. **20**(3): p. 165-6.
87. Joshi, S., et al., *Cutaneous cryptococcosis*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 242-3.
88. Al-Tawfiq, J.A. and J. Ghandour, *Cryptococcus neoformans abscess and osteomyelitis in an immunocompetent patient with tuberculous lymphadenitis*. Infection, 2007. **35**(5): p. 377-82.
89. McDonnell, P.J., et al., *Ocular involvement in patients with fungal infections*. Ophthalmology, 1985. **92**(5): p. 706-9.
90. Traboulsi, R., Z.A. Kanafani, and S.S. Kanj, *Fungal infections of the genitourinary tract*. J Med Liban, 2004. **52**(4): p. 202-9.
91. Larsen, R.A., et al., *Persistent Cryptococcus neoformans infection of the prostate after successful treatment of meningitis*. California Collaborative Treatment Group. Ann Intern Med, 1989. **111**(2): p. 125-8.
92. Crump, J.A., *The global burden of typhoid fever*. . Bull. WHO, 2004. **82**(346-353).

93. WHO., *Revised Global Burden of Disease (GBD) 2002 Estimates* 2002.
94. Park, B.J., *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS*. AIDS, 2009. **23**(525-530).
95. Saha, D.C., et al., *Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 8): p. 1098-105.
96. Baro, T., et al., *Serotyping of Cryptococcus neoformans isolates from clinical and environmental sources in Spain*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(4): p. 1170-2.
97. Canteros, C.E., et al., *A rapid urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia, 1996. **136**(1): p. 21-3.
98. Smith, M.B., et al., *Comparative performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2697-8.
99. Salkin, I.F., *Further simplification of the Guizotia abyssinica seed medium for identification of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus bacillispora*. Can J Microbiol, 1979. **25**(9): p. 1116-8.
100. Min, K.H. and K.J. Kwon-Chung, *The biochemical basis for the distinction between the two Cryptococcus neoformans varieties with CGB medium*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1986. **261**(4): p. 471-80.
101. Kwon-Chung, K.J., I. Polacheck, and J.E. Bennett, *Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (serotypes B and C)*. J Clin Microbiol, 1982. **15**(3): p. 535-7.
102. Dufait, R., R. Velho, and C. De Vroey, *Rapid identification of the two varieties of Cryptococcus neoformans by D-proline assimilation*. Mykosen, 1987. **30**(10): p. 483.

103. Sidrim, J.J., et al., *Molecular methods for the diagnosis and characterization of Cryptococcus: a review*. Can J Microbiol, 2010. **56**(6): p. 445-58.
104. Institute, C.a.L.S., *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standards, 3er ed. M27-A3*. . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. , 2008.
105. Bennett, J.E., et al., *A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptoccal meningitis*. N Engl J Med, 1979. **301**(3): p. 126-31.
106. Testore, G.P., et al., *In vitro fluconazole susceptibility of 1565 clinical isolates of Candida species evaluated by the disk diffusion method performed using NCCLS M44-A guidelines*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004. **50**(3): p. 187-92.
107. Martinez, L.R., et al., *Voriconazole inhibits melanization in Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(12): p. 4396-400.
108. Lamb, D.C., et al., *Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant Cryptococcus neoformans from AIDS patients*. FEBS Lett, 1995. **368**(2): p. 326-30.
109. Isnard, F., et al., *[Impact on renal function of an early switch from conventional to liposomal amphotericin B formulation in the empirical treatment of fungal infections]*. Med Mal Infect, 2008. **38**(4): p. 208-14.
110. Hamill, R.J., et al., *Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(2): p. 225-32.
111. Cagnoni, P.J., et al., *Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients*. J Clin Oncol, 2000. **18**(12): p. 2476-83.

112. Larsen, R.A., et al., *Correspondence of in vitro and in vivo fluconazole dose-response curves for Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3297-301.
113. Mavrogiorgos, N., et al., *Efficacy of voriconazole in experimental Cryptococcus neoformans infection*. Mycopathologia, 2006. **162**(2): p. 111-4.
114. Klein, K.R., et al., *Identification of Cryptococcus gattii by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(11): p. 3669-72.
115. Pfaller, M.A., et al., *Global trends in the antifungal susceptibility of Cryptococcus neoformans (1990 to 2004)*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2163-7.
116. Brandt, M.E., et al., *Trends in antifungal drug susceptibility of Cryptococcus neoformans isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(11): p. 3065-9.
117. Datta, K., et al., *Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of Cryptococcus neoformans at a tertiary care centre in India: a need for care*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(4): p. 683-6.
118. Klepser, M.E. and M.A. Pfaller, *Variation in electrophoretic karyotype and antifungal susceptibility of clinical isolates of Cryptococcus neoformans at a university-affiliated teaching hospital from 1987 to 1994*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(12): p. 3653-6.
119. Yildiran, S.T., et al., *In vitro susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of Cryptococcus neoformans collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592)*. Mycoses, 2002. **45**(9-10): p. 378-83.
120. Pfaller, M.A., et al., *In vitro susceptibilities of clinical isolates of Candida species, Cryptococcus neoformans, and Aspergillus species to itraconazole:*

- global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(8): p. 3807-10.
121. Chandenier, J., et al., *In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 Cryptococcus neoformans isolates from Africa and Cambodia.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(6): p. 506-8.
  122. Bicanic, T., et al., *Antiretroviral roll-out, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis.* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 530-1.
  123. Bicanic, T., et al., *Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole.* Clin Infect Dis, 2007. **45**(1): p. 76-80.
  124. Perkins, A., et al., *Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of Cryptococcus neoformans var. neoformans.* J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(6): p. 1144-7.
  125. Bicanic, T., et al., *Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution.* Clin Infect Dis, 2006. **43**(8): p. 1069-73.
  126. Gomez-Lopez, A., et al., *In vitro susceptibility of Cryptococcus gattii clinical isolates.* Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(7): p. 727-30.
  127. Morera-Lopez, Y., et al., *Cryptococcus gattii: in vitro susceptibility to the new antifungal albaconazole versus fluconazole and voriconazole.* Med Mycol, 2005. **43**(6): p. 505-10.
  128. Mitchell, T.G. and J.R. Perfect, *Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans.* Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 515-48.

129. Bertout, S., et al., *Genetic multilocus studies of different strains of Cryptococcus neoformans: taxonomy and genetic structure*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(3): p. 715-20.
130. Brandt, M.E., S.L. Bragg, and R.W. Pinner, *Multilocus enzyme typing of Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(10): p. 2819-23.
131. Perfect, J.R., B.B. Magee, and P.T. Magee, *Separation of chromosomes of Cryptococcus neoformans by pulsed field gel electrophoresis*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2624-7.
132. Currie, B.P., L.F. Freundlich, and A. Casadevall, *Restriction fragment length polymorphism analysis of Cryptococcus neoformans isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(5): p. 1188-92.
133. Boekhout, T. and A. van Belkum, *Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of Cryptococcus neoformans*. Curr Genet, 1997. **32**(3): p. 203-8.
134. Fraser, J.A., et al., *Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island Cryptococcus gattii outbreak*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1360-4.
135. Hanafy, A., et al., *Multilocus microsatellite typing for Cryptococcus neoformans var. grubii*. Med Mycol, 2008. **46**(7): p. 685-96.
136. Karaoglu, H., C.M. Lee, and W. Meyer, *Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(3): p. 639-49.
137. Meyer, W. and T.G. Mitchell, *Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in Cryptococcus neoformans*. Electrophoresis, 1995. **16**(9): p. 1648-56.
138. Fries, B.C., et al., *Karyotype instability in Cryptococcus neoformans infection*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(6): p. 1531-4.



139. Garcia-Hermoso, D., et al., *Are two Cryptococcus neoformans strains epidemiologically linked?* J Clin Microbiol, 2001. **39**(4): p. 1402-6.
140. Sorrell, T.C., et al., *Concordance of clinical and environmental isolates of Cryptococcus neoformans var. gattii by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(5): p. 1253-60.
141. Meyer, W., et al., *Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of Cryptococcus neoformans.* J Clin Microbiol, 1993. **31**(9): p. 2274-80.
142. Bovers, M., et al., *AIDS patient death caused by novel Cryptococcus neoformans x C. gattii hybrid.* Emerg Infect Dis, 2008. **14**(7): p. 1105-8.
143. Calvo, B.M., et al., *Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of Cryptococcus neoformans from Brazil, Chile, and Venezuela.* J Clin Microbiol, 2001. **39**(6): p. 2348-50.
144. Cogliati, M., et al., *Genotyping Cryptococcus neoformans var. neoformans with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy.* Med Mycol, 2000. **38**(2): p. 97-103.
145. Franzot, S.P., et al., *Molecular epidemiology of Cryptococcus neoformans in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure.* J Clin Microbiol, 1997. **35**(9): p. 2243-51.
146. Cogliati, M., et al., *Cryptococcus neoformans population includes hybrid strains homozygous at mating-type locus.* FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 608-13.
147. Granados, D.P. and E. Castaneda, *Influence of climatic conditions on the isolation of members of the Cryptococcus neoformans species complex from trees in Colombia from 1992-2004.* FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 636-44.

148. Bovers, M., et al., *Six monophyletic lineages identified within Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii by multi-locus sequence typing*. Fungal Genet Biol, 2008. **45**(4): p. 400-21.
149. Arguero Licea, B., A. Cervantes Olivares, *Isolation and characterization of C. neoformans var. gattii from samples of Eucalyptus canaldulensis in Mexico city*. Rev. Iberoam. Micol, 1999. **16**: p. 40-42.

## APÉNDICES

### A. Preparación de reactivos

#### *-Acetato de sodio 3M pH 5.2-*

##### **Ingredientes**

- 12.3 g de acetato de sodio

##### **Método:**

Se disolvió acetato de sodio en 25 mL de agua destilada, se ajustó el pH con ácido acético glacial, se aforó a 50 mL y se llevó a esterilización en autoclave.

#### *- Agar alpiste negro -*

##### **Ingredientes:**

- 50 g *Guizotia abyssinica* (semilla de niger)
- 1 g de glucosa
- 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ortofosfato diácido de potasio)
- 1 g de creatinina
- 15 g de Bacto-agar
- 0.5 mL de penicilina G (20 unidades / ml)
- 0.5 mL de Gentamicina (40 mg / ml)

##### **Método:**

Se molieron las semillas de *Guizotia abyssinica* lo más fino posible con una batidora eléctrica y se agregaron a 1000 mL de agua destilada en un recipiente de acero inoxidable, posterior a ello se hirvió durante 30 minutos, se pasó a través de papel de filtro y se ajustó el volumen a 1000 mL. Se agregaron los ingredientes restantes. (Excepto el agar) al filtrado y se disolvieron, el medio se llevó a temperatura ambiente y pH a 5.5. El medio se distribuyó en botellas de 500 mL, a cada botella se añadieron 7,5 g de agar. Se introdujeron a la autoclave a 110 °C durante 20 minutos. Después de la esterilización y cuando el medio alcanzó la temperatura ambiente se añadió 0.5 mL de penicilina G y 0.5 mL de gentamicina a cada botella. Se mezcló suavemente y se vació en placas de Petri de plástico.

**- Agar canavanin glicina azul de bromotimol -**

**Ingredientes:**

**Solución A:**

- 10g de glicina
- 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1 g de  $\text{MgSO}_4$
- 1 mg de Tiamina HCl
- 30 mg de L-canavanina sulfato

**Método:**

Se disolvieron los ingredientes de la solución A en 100 mL de agua destilada y se ajustó a un pH de 5 a 6. Se procedió a esterilizarlo mediante filtración con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se guardó en refrigeración.

**Solución B:**

- 0.4 g de azul de bromotimol
- 64 mL de NaOH 0,01 N
- 36 mL de agua destilada

**Método:**

Se prepararon 20 mL de la solución B, 20 g de agar y 880 mL de agua destilada. Se mezclaron y se esterizaron a 15 lb por 15 min en la autoclave. Se enfrió a 50 °C y se agregó 100 mL de la solución A. Se mezcló el medio y se distribuyó en placas de Petri de plástico.

**-Agar dextrosa sabourad-**

**Ingredientes:**

- 40 g de Dextrosa
- 5 g de Peptona de Caseína 5.0
- 5 g de Digerido Pancreático de Tejido Animal
- 15 g de Bacto-agar

**Método:**

Se suspendió 65 g del medio en un litro de agua purificada, se calentó con agitación suave hasta su completa disolución, se esterilizó en autoclave, se enfrió a una temperatura entre 45-50°C y se vació en placas de Petri estériles.

**-BaCl<sub>2</sub> al 1% -**

**Ingredientes:**

- 1g de  $\text{BaCl}_2$

**Método:**

Se disolvió 1 g de  $\text{BaCl}_2$  en 100 mL de agua destilada.

***-Bromuro de etidio 0.5 mg/mL -***

**Ingredientes:**

- 25 mg de Bromuro de etidio

**Método:**

Se disolvieron 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura y se aforaron a 50 mL, se almacenó a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar, se realizó una dilución 1:250 de la solución stock (1 mL del stock + 249 mL de agua ultrapura).

***-CTAB/NaCl-***

**Ingredientes**

- 14.1 g de NaCl
- 10 g de CTAB

**Método:**

Se disolvió NaCl en 80 mL de agua destilada, se agregó lentamente CTAB, calentó mientras se mezclaban a 65°C y se ajustó a un volumen de 100 mL.

***-EDTA-***

***(Ácido etilendiaminotetraacético) 500 mM pH 8.0***

**Ingredientes:**

- 9.306 g de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O
- NaOH

**Método:**

Se disolvió Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O en 40 mL de agua ultrapura, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH y se llevó a aforación a 50 mL. y se esterilizó en autoclave.

***-Etanol al 70%-***

**Ingredientes**

- 70 mL de etanol

**Método:**

Se mezcló de etanol al 100% más 30 mL de agua destilada estéril.

***-Fenol saturado-***

**Ingredientes:**

- 500 g de fenol
- Tris-HCl 0.5M y 0.1M

**Método:**

Se difundió el fenol en baño de agua, se agregó hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante), se añadió solución amortiguadora Tris-HCl 0.5M pH 8.0 y se mezcló hasta que el pH de la fase fenólica fue mayor a 7.8, se agitó durante 24 horas en cuarto frío, transcurrido este tiempo se eliminó la fase acuosa con una pipeta; se repitió la misma operación pero con Tris-HCl 0.1M pH 8.0, se eliminó la fase acuosa final y se añadieron 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1M pH 8.0 conteniendo β-mercaptoetanol a una concentración 0.2%

***-Gel de agarosa al 1.4% -***

**Ingredientes**

- 1.4 g de agarosa
- 100 mL de TBE 0.5X
- 10 µL de bromuro de etidio (2 µg/mL)

**Método:**

Se disolvió 1.4 g de agarosa grado biología molecular en 100 mL de TBE 0.5X, se calentó hasta disolución total, se añadieron 10 µL de bromuro de etidio, se mezcló y se vació en la cámara de electroforesis.

***-Jugo azul 6x (Buffer de carga para electroforesis)-***

**Ingredientes**

- 25 mg de azul de bromofenol
- 25 mg de xilencianol
- 3.0 mL de glicerol en TE 1x pH 8.0

**Método:**

Se disolvieron los ingredientes y se aforaron a 10 mL.

***-NaCl 5M-***

**Ingredientes**

- 292.2 g NaCl

**Método:**

Se disolvió NaCl en 800 mL de agua destilada y se ajustó a 1L, posterior a ello se esterilizó en autoclave.

***-Proteinasa K 10mg/mL-***

**Ingredientes**

- 100 mg de proteinasa K
- 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5

**Método:**

Se disolvió la proteinasa K en Tris-HCl.

***-SEVAG-***

**Ingredientes**

- 24 mL de Cloroformo
- 1 mL de alcohol isoamílico

**Método:**

Se disolvió en cloroformo y alcohol isoamílico.

***-SDS al 10%-***

**Ingredientes**

- 5 g de SDS

**Método:**

Se disolvió lentamente SDS en 50 mL de agua destilada.

***-Solución salina al 0.85%-***

**Ingredientes:**

- 0.85 g de NaCl

**Método:**

Se disolvió NaCl en 100 mL de agua destilada y se llevó a esterilizar en autoclave.

***-TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 10x (Stock)-***

**Ingredientes:**

- 54 g de Tris-base
- 27.5 g de ácido bórico
- 20 mL de EDTA 500 mM

**Método:**

Se disolvieron el Tris-base y ácido bórico en EDTA y en agua ultrapura, aforó a 500 mL se llevó a esterilizar en autoclave, se preparó la solución de trabajo (0.5x), se mezcló 50 mL del stock en agua destilada estéril y se aforó a 1L.

***-TE (Tris-EDTA) 1x pH 8.0-***

**Ingredientes:**

- 500 µL de Tris-HCl 500 mM pH 8.0
- 50 µL de EDTA 500 mM

**Método:**

Se disolvió Tris-HCl y EDTA en agua destilada, se ajustó a un pH de 8.0 y se llevó a aforación a 25 mL y esterilizó en autoclave.

***-Tris-HCl 500 mM pH 8-***

**Ingredientes:**

- 30.3 g de Tris-base
- HCl concentrado

**Método:**

Se disolvió Tris-base en 300 mL de agua ultrapura, se ajustó el pH a 8.0 con HCl concentrado y se aforó a 500 mL.

***-Urea de Christensen-***

**Ingredientes:**

- 0.1 g de peptona
- 0.5 g de glucosa
- 0.5 g de NaCl
- 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1.5 g de agar
- 0.012 g de rojo fenol

**Método:**

Se disolvieron los componentes y se ajustó a un pH de 6.8. Se esterilizó el medio, se enfrió y se añadió urea al 20%, 0.5 mL por cada 4.5 mL de medio. La urea se esteriliza previamente para filtración.